

Die Gewebsspeicherung von Vitamin E
[dl - α - Tocopherol - (acetat)]
in Abhängigkeit
unterschiedlicher Applikationsformen

Christian Floegel

1961

Aus dem Institut für Physiologie und Ernährung der Tiere
der Universität München
Vorstand: Professor Dr. Dr. Johannes Brüggemann

DIE GEWEBSSPEICHERUNG VON VITAMIN E
[dl - α - Tocopherol-(acetat)]
IN ABHÄNGIGKEIT
UNTERSCHIEDLICHER APPLIKATIONSFORMEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der veterinärmedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

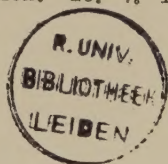
von
Christian Floegel
Tierarzt
aus
Breslau /Schlesien

München 1961

Dekan: Prof. Dr. Adolf Meyn

Referent: Prof. Dr. Dr. Johannes Brüggemann

Tag der Promotion: 26. 7. 1961



INHALTSÜBERSICHT

	Seite
I. Einleitung und Problemstellung	1
II. Literatur	3
A. Geschichte des Vitamin E	3
B. Physiologie des Vitamin E	12
C. Vitamin E-Mangelerkrankungen	15
1) Vitamin E und Fruchtbarkeit	15
2) Vitamin E und Muskelschäden	18
3) Vitamin E und Leberschäden	22
4) Vitamin E in der Therapie verschiedener Haustierkrankungen	25
III. Eigene Untersuchungen	28
A. Prinzip der Versuchsanstellung	28
B. Prinzip der chemischen Vitamin E-Bestimmung	28
C. Reagentien	29
1) Organaufarbeitung	29
2) Kolorimetrische Bestimmung	29
D. Aufstellen einer Eichkurve	30
E. Kolorimetrische Bestimmung	31
F. Vorversuche	33
G. Endgültige Analysenmethode	36
H. Auswahl der Tiere	38
I. Verwendete Vitamin E-Präparate	38
K. Entnahme der Organe	39
IV. Versuchsergebnisse und Diskussion	41
V. Zusammenfassung	48
VI. Literatur	49

I. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Seit den klassischen Untersuchungen von Evans (1) im Jahre 1922, die zur Entdeckung des Vitamins E führten, sind mehr als 3 Jahrzehnte vergangen. Obwohl die ursprünglichen Vorstellungen über das Vitamin E als "Antisterilitätsvitamin" zwischenzeitlich eine erhebliche Veränderung und Erweiterung erfahren haben, muß die Aufklärung seiner biochemischen Funktion als unvollkommen bezeichnet werden.

In der Humanmedizin hat sich dieses Vitamin ein erstaunlich großes Anwendungsgebiet erobert. So wird es bei Erkrankungen des Muskel- und Kreislaufapparates, des Hormon- und Fermentstoffwechsels und bei Störungen des neurovegetativen Systems angewandt. Besonders bewährt hat es sich bei dystrophischen Erkrankungen des Mesenchyms, ein Umstand der dazu geführt hat, daß bereits eine Namensänderung in "antidystrophisches Vitamin" vorgeschlagen wurde (2).

In der Tiermedizin wurde das Vitamin E therapeutisch vornehmlich bei Fruchtbarkeitsstörungen eingesetzt. Hierbei ging man von der Annahme aus, daß bei derartigen Krankheitsfällen ein Mangel an diesem Wirkstoff vorliege. Es hat sich jedoch gezeigt, daß z.B. bei der Hauptindikation auf veterinärmedizinischem Gebiet, der Zyklussterilität des Rindes, weder in der Leber, noch im Blut, in Hypophyse und Ovarien, ein mangelnder Gehalt an Vitamin E vorliegt (3). So darf man annehmen, daß die in der tierärztlichen Praxis beobachteten Heilerfolge von Zyklussterilitäten nach Applikation von Vitamin E-Präparaten kaum durch eine ausreichende Versorgung eines an diesem Wirkstoff verarmten Organismus zu erklären sind. Vielmehr ist nach Applikation therapeutisch hoher Dosen von Vitamin E - etwa dem zehnfachen des physiologischen Bedarfs - an Tiere, die im allgemeinen mit diesem Wirkstoff über die Fütterung ausreichend versorgt sind, eine unspezifische Wirkung desselben zu diskutieren, die das pathologische Sistieren sexualzyklischer Abläufe günstig beeinflussen kann.

Unter diesen Umständen sollte eine sogenannte Vitamin E-"Stoßtherapie" Heilerfolge am sichersten erwarten lassen.

Bisher erfolgte der Einsatz des Vitamins E bei der Behandlung der Zyklus-

sterilität des Rindes über eine einmalige intramuskuläre Applikation des öllöslichen Tocopherolacetats. Intramuskulär gespritzte ölige Wirkstofflösungen werden relativ langsam vom Blutstrom aufgenommen. Eine Vitamin-"Stoßtherapie" wird bei dieser Applikationsart kaum zu erzielen sein.

Auf Grund dieser Überlegungen stellte mir Herr Prof. Dr. Dr. Brüggemann die Aufgabe, nachzuweisen, ob im Gegensatz zu der bisher gebräuchlichen intramuskulären Injektion des öligen Vitaminpräparates eine anderweitige Applikationsform Vorteile hinsichtlich einer schnelleren Vitamin E-Verteilung im Organismus und somit des erwünschten therapeutischen Effektes bieten kann. Durch eigene experimentelle Untersuchungen sollte dargetan werden, ob die Gewebsverteilung des Vitamins E nach intramuskulärer bzw. intravenöser Injektion Unterschiede aufweist.

Gleichfalls war festzustellen, ob die Applikation des dl - α - Tocopherols gegenüber seiner veresterten Form, dem dl - α - Tocopherolacetat, zu unterschiedlichen Resultaten führt.

II. LITERATUR

A. Geschichte des Vitamins E

Im Jahre 1920 entdeckte man neben den bisher bekannten, einen neuen für die Fortpflanzung notwendigen Wirkstoff (4). Damals wurde beobachtet, daß Ratten, die nur mit Milch gefüttert werden, gewöhnlich Sterilität zeigen, obwohl sie sich bei gutem Wachstum und guter Kondition befinden.

Klassisch geworden ist die Arbeit von Evans und Bishop (1) aus dem Jahre 1922. Die Verfasser verabreichten an Ratten eine Diät, welche die Vitamine A, die des B-Komplexes, sowie alle bisher bekannten unentbehrlichen Nährstoffe in ausreichender Menge enthielt. Dennoch entwickelten sich in der ersten Generation Fruchtbarkeitsstörungen, die in der zweiten Generation zu vollständiger Sterilität führten. Diese Sterilität ließ sich durch Zufuhr von grünen, frischen Salatblättern oder auch getrockneter Luzerne heilen. Die Verfasser nannten diesen Stoff, der in der natürlichen Nahrung enthalten ist und diese Sterilität verhindert oder heilt, die "Substanz X". Ein Jahr später erkannten sie den Wirkstoff als fettlöslich und als nicht identisch mit den bisher bekannten fettlöslichen Vitaminen A und D. Sie bezeichneten ihn als "Antisterilitätsvitamin" (5). Sure reihte dieses Vitamin unter die bisher bekannten ein und bezeichnete es als Vitamin E (6).

1936 isolierten Evans und Emerson zwei im biologischen Test an der Ratte wirksame Faktoren aus dem Weizenkeimöl, die sie als α und β - Tocopherol ⁺) bezeichneten (7).

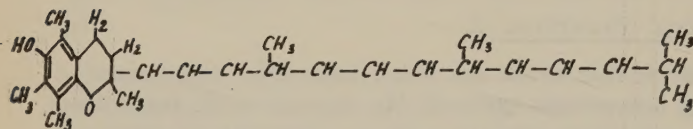
Noch ehe die Strukturformel des α - Tocopherols endgültig sichergestellt war, gelang es Karrer und Mitarb., das Vitamin E synthetisch durch Kondensation von Trimethylhydrochinon mit Phytolbromid zu erhalten (8). Bald darauf gelang die Synthese nach Todd und Mitarb. (9).

Das α - Tocopherolmolekül besteht aus einem bizyclischen Grundkörper, dem 2, 5, 7, 8 - Tetramethyl-6-oxychroman und einer terpenoiden Seitenkette, in der auch ein Bestandteil des Chlorophylls, das Phytol zu erkennen ist (10).

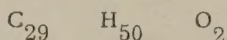
⁺) (Tocopherol griech. tocos =

Nachkommenschaft, pherein = gebären, ol = Alkohol)

Damit ist dem α -Tocopherol folgende Strukturformel zuzuschreiben:



Deren Summenformel lautet:



Eigenschaften des natürlichen d - α - Tocopherols

Das α -Tocopherol ist ein blaßgelbes, zähflüssiges Öl, mit dem Brechungsindex $n_D = 1,5052$, der Jodzahl 143 und dem spez. Gew. 0,933. Es ist leicht löslich in Äther, Petroläther, Benzol, Chloroform und Fetten, weniger leicht in Aceton und Alkohol, unlöslich in Wasser (11).

Von Säuren und Alkalien wird es bei Temperaturen bis 40°C nicht angegriffen. Gegen Hitze ist es sehr widerstandsfähig und verträgt Temperaturen bis 200° . Unter Luftabschluß kann es sogar bis 250° , ohne Veränderungen zu erleiden, erhitzt werden.

Daher wird durch Kochen und Backen Vitamin E kaum beeinflusst (12).

In fein verteilter Zustand wird es von Sauerstoff besonders in kolloidalen Lösungen und bei Ausbreitung auf große Oberflächen, wie z.B. durch Adsorption an eine Aluminiumoxydsäule (13) angegriffen. Empfindlich ist es auch gegenüber weiteren oxydierenden Substanzen wie Ozon, Permanganat, Silbernitrat, Eisenchlorid, Benzoeperensäure, Brom und Chlor. Durch Peroxyde, die z.B. in ranzigen Fetten vorkommen, wird das Vitamin E gleichfalls zerstört (14). Das bedeutet, daß für ölige Wirkstofflösungen nur solche Öle und Fette verwendet werden dürfen, die nur in geringem Maße autoxydativen Prozessen unterliegen. Die Zerstörung durch Peroxyde kann durch Zusatz von Antioxydantien, wie z.B. Hydrochinon, gehemmt werden. Auch in der Natur ist Vitamin E von Stoffen begleitet, die als sogenannte "Co-Vitamine" die Oxydation der Tocopherole verhindern (15). Durch Veresterung kann die Empfindlichkeit gegenüber Sauerstoff ohne Verminderung ihrer biologischen Aktivität herabgesetzt werden (13).

Im Laufe der Jahre wurden 6 chemische Verwandte des α -Tocopherols bekannt:

Beta Tocopherol	Evans und Emerson (7)
Gamma "	Emerson (16)
Delta "	Stern, Robeson, Weisler, Baxter (17)
Epsilon "	Green, Mercinkiewicz und Watt (18)
Zeta	Egitt und Ward (19)
Eta	Green, Mercinkiewicz (20)

Die biologische Aktivität der sieben bekannten natürlichen Tocopherole ist sehr unterschiedlich. Der Nachweis hierfür wurde von verschiedenen Autoren durch biologische Versuche an der Ratte erbracht.

So verhalten sich

$\alpha : \beta : \gamma : \delta =$	100 : 40 : 8 : 1	Weisler, Baxter, Ludwig (21)
$\alpha : \beta : \gamma =$	100 : 30 : 20	Hove, Harris (22)
$\alpha : \beta : \gamma : \delta =$	100 : 30 : 8,3 : 1	Bicknell (23)
$\alpha : \beta : \gamma =$	100 : 50 : 25	Mason (24)

Über die Wirkung von Zeta-Tocopherol berichtet Ames (25), daß es wesentlich weniger aktiv als Alpha-Tocopherol ist, während er das Epsilon-Tocopherol in der Wirkung dem Delta-Tocopherol gleichstellt.

Die synthetischen Tocopherole verhalten sich ähnlich.

$\alpha : \beta : \gamma =$	100 : 25 : 19	Bicknell (23)
$\alpha : \beta : \gamma =$	100 : 30-50 : 20-30	Karrer, König, Ringier, Salomon (26)

Der in vivo zur Geltung kommende und für biologische Phänomene verantwortliche Effekt der einzelnen Tocopherole hängt nicht nur von der Strukturformel, sondern auch vom Umfange ihrer Speicherung durch den Organismus ab und unterscheidet sich daher oft von dem in vitro Versuchen beobachteten (27). Die Speicherung im Körperfett nimmt in der Reihenfolge $\alpha : \beta : \gamma$ ab (28).

Obwohl somit seit mehreren Jahren klar erwiesen ist, daß die historische Bezeichnung Vitamin E nicht nur für eine chemisch exakt zu definierende Substanz zutrifft, sondern eine Gruppe chemisch verwandter und genau benannter Substanzen umfaßt, ist heute noch in vielen Publikationen der Begriff Vitamin E gebräuchlich. Hierfür dürften 2 Eigenschaften verantwort-

lich sein, die alle Tocopherole gemeinsam besitzen, nämlich ihre im Tierversuch erwiesene qualitativ gleiche biologische Aktivität und ihr gleichwertiges Ansprechen auf ein für alle Tocopherole anwendbares chemisches qualitatives Bestimmungsverfahren.

Die Auftrennung aller in einem Produkt enthaltenen Tocopherole kann durch spezielle chromatographische Verfahren erfolgen, die ja auch zu ihrer Entdeckung geführt haben. Diese Methode dürfte jedoch für Reihenuntersuchungen im allgemeinen zu aufwendig sein. Daher haben sich bei medizinischen Untersuchungen die einfacheren Bestimmungsverfahren eingeführt, mit denen lediglich als Vitamin E alle vorhandenen Tocopherole erfaßt werden.

Wenn in den folgenden Abschnitten die Bezeichnungen Vitamin E oder Tocopherole gebraucht werden, so sind damit jeweils die Gesamtocopherole gemeint. Beziehen sich Mitteilungen auf spezielle Tocopherole, sind diese als solche gekennzeichnet, wie z.B. dl- α -Tocopherol, d- β -Tocopherol, usw.

Der Nachweis des Vitamins E erfolgt mit chemischen oder biologischen Methoden.

Es sind im Laufe der Jahre derart viele verschiedene chemische Methoden ausgearbeitet worden, daß es zu weit führen würde, sie alle zu erwähnen. Es sollen daher nur einige angeführt werden, die eine umfassendere Anwendung gefunden haben:

Die Reduktionsmethode

Die potentiometrische Methode von Karrer und Keller (29) beruht auf einer Reduktion der Tocopherole mit Goldchlorid, wobei der Endpunkt der Reaktion potentiometrisch ermittelt wird. Je Mol Tocopherol werden 2 Äquivalente Goldchlorid verbraucht.

Farbreaktionen

- a) Eingeführt hat sich die fluorometrische Methode nach Kofler (30), bei der die Bestimmung der Tocopherole nach Oxydation mit Salpetersäure zu Tocopherolrot und anschließender Kondensation mit 1,2-Phenylen-diamin erfolgt. Die Konzentration wird mit einem photoelektrischen Fluorometer ermittelt.
- b) Als bekannteste Farbreaktion dürfte die nach Emmerie und Engel (31) anzusprechen sein. Die Bestimmung des Vitamins E erfolgt nach

Verseifung und chromatographischer Reinigung an Al_2O_3 in Benzol nach Zusatz von Eisen III-Chlorid und α - α -Dipyridyl in alkoholischer Lösung. Die Konzentration wird kolorimetrisch ermittelt.

- c) Der Methode nach Furter und Meyer (32) liegt lediglich die Oxydation von Tocopherolen mit konz. Salpetersäure zu Grunde, wobei das entstehende Tocopherolrot unmittelbar kolorimetrisch quantitativ bestimmt wird.

Der Nachweis der Tocopherole mit biologischen Methoden erfolgt im prophylaktischen Test.

Bacharach und Mitarbeiter (33), Evans und Burr (34) sowie Karrer und Demole (35) verwandten Ratten als Testtiere.

Hierbei füttert man infantile Rattenweibchen 3 - 4 Wochen lang mit einer Vitamin E-freien Kost. (Zweckmäßig ist es, die für die Versuche bestimmten Tiere schon dadurch an Vitamin E zu verarmen, indem man den Muttertieren der für den E-Mangelversuch bestimmten Jungen während des Säugens eine vitamin E-arme Kost verabreicht). Bei diesen Tieren tritt nach Kopulation zunächst normale Trächtigkeit ein. Nach 10 - 15 Tagen sterben jedoch die Föten ab und werden resorbiert.

Zur Auswertung eines unbekannten vitamin E-haltigen Präparates benötigt man drei Gruppen vorbereiteter Testtiere.

Den Tieren der Gruppe I wird das zur prüfende Präparat in einer Menge verabreicht, die gerade das normale Austragen von Jungen gewährleistet.

Die Tiere der Gruppe II erhalten die Dosis eines Standardpräparates, die gerade zur Heilung der Sterilität führt.

Die III. Gruppe dient der negativen Kontrolle. Die Tiere werden weiterhin mit einer Vitamin E-Mangeldiät ernährt. Das Ausbleiben der Geburt von Jungen soll hier zur Kontrolle der Reproduzierbarkeit des Testes dienen.

Fundiert auf die Ergebnisse der biologischen Testmethoden, wurden die Wirkstoffeinheiten für das Vitamin E festgesetzt. Danach entspricht eine internationale Einheit (1 IE) des Vitamins E der Wirkung von 1 mg d,l- α -Tocopherolacetat. Diese Einheit führt auch die Bezeichnung 1 MFD (1 "median fertility dose"), da diese Menge im biologischen Test an der Ratte dazu in der Lage ist, bei 50 % der Tiere die Resorption der Foeten zu verhindern (36). Nach Harris und Mitarb. beträgt 1 MFD 0,75 mg natürl. d- α -Tocopherol (37).

Vorkommen

Das Vitamin E kommt in der Natur weitverbreitet in Pflanzen, tierischen Organen und Produkten vor. Abderhalden betont auf Grund des Nachweises von Vitamin E in allen Organen des Menschen, des Foetus und des Neugeborenen seine Lebensnotwendigkeit (38). Jedoch scheint es kein integrierender Bestandteil der lebenden Zelle zu sein. In Bakterien, Pilzen und Protozoen wurde es nicht aufgefunden (39).

Bisher ist es nicht erwiesen, daß der tierische Körper Vitamin E selbst aufzubauen in der Lage ist. Man muß daher annehmen, daß alles Vitamin E, das sich im tierischen Organismus vorfindet, aus der pflanzlichen Nahrung stammt, bzw. aus den Beutetieren (40). Demzufolge ist es naheliegend anzunehmen, daß der Gehalt tierischer Organe und Produkte an Vitamin E mit dessen Gehalt in ihrer Nahrung in engem Zusammenhang steht.

Besonders reich an Vitamin E sind die Keime von Getreidekörnern, wobei die Gehalte im Samen von Weizen, Reis, Mais, Erbsen und Bohnen nach Binnington und Andrews (41) in derselben Größenordnung von 1 - 3 mg % liegen. Jedoch werden für Mais und Weizen von anderen Autoren Gehalte bis 7 mg angegeben. Die vitamin E-reichste Frucht ist die Hagebutte, deren Öl bis zu 2,5 % Vitamin E enthält (42). In Gräsern, Klee und Luzerne werden Mengen zwischen 10 - 40 mg % gefunden. Heugewinnung bringt jedoch einen Verlust von etwa 35 % mit sich, der sich durch lange Lagerung bis zum Ende des Winters noch bedeutend vermehren kann. In guter Silage bleibt das Vitamin E dagegen weitgehend erhalten (43).

In der Natur findet man meist ein Gemisch der einzelnen Tocopherole, wobei der Hauptanteil keineswegs immer auf das α -Tocopherol mit der größten biologischen Wirksamkeit entfällt. Das zeigt folgende Aufstellung von Quaife (44) über den Gehalt verschiedener pflanzlicher Öle an den einzelnen Tocopherolisomeren.

Öl	Gesamtgehalt an Vitamin E in mg/g	α -	β -	δ -	γ -Tocopherol in mg/g
Mais -	1,020	0,126	---	0,894	-----
Baumwollsam -	0,870	0,493	---	0,377	-----
Sojabohnen -	0,740	0,096	---	0,418	0,225
Weizenkeimlinge -	2,680	1,610	1,07	-----	-----

Vorkommen in Organen

Über den Gehalt einzelner tierischer Organe an Vitamin E liegen von vielen Autoren Angaben vor, die oft recht unterschiedliche Werte zeigen. Dieser Umstand ist zum Teil auf unterschiedliche, nicht immer spezifische Bestimmungsmethoden, teils auf die jeweilige Konstitution des Tieres und die vorangegangene Zufuhr von Vitamin E mit der Nahrung zurückzuführen. Man hat versucht, durch Bestimmung des Vitamin E-Gehaltes des Blutserums auf eine Gesamtversorgung des Körpers mit diesem Wirkstoff zu schließen.

Beckmann (45) sagt hierzu: "Ob und in welchem Maße auf Grund von Serum - Tocopherolwerten der Vitamin E-Haushalt des Organismus beurteilt werden kann bzw. Schlußfolgerungen in Bezug auf Hypo- oder gar Avitaminosen gezogen werden können, ist bisher nicht eindeutig entschieden."

Brüggemann und Niesar (46) konnten durch Analysen von 50 Leber- und Blutproben des Rindes und ebensovieler Analysen von Leber- und Blutproben des Schweines beweisen, daß eine Abhängigkeit der Vitaminblutgehalte von dem Vitaminspeicher der Leber nicht besteht. Sie halten das Fehlen einer Abhängigkeit bei der bekannten allgemeinen Wirkung des Vitamins E im Körper nicht für verwunderlich und sind der Ansicht, daß das Vitamin E je nach Bedarf der peripheren Reaktionslage verbraucht wird und nur dann in erhöhten Gehalten im Blut nachzuweisen ist, wenn es vermehrt von den zentralen Speicherorganen in die Peripherie übergeführt, oder aber durch reichliche alimentäre Zufuhr über das Transportmittel Blut den Körperspeichern zugeleitet wird.

Der Gehalt einiger tierischer Gewebe und Produkte an Vitamin E sei in folgender Zusammenstellung tabellarisch aufgezeigt:

Untersuchungs- material		Gehalt in mg %	Literatur
Blut	(Pferd	0,002 - 0,0025	Kaag van der; Teunissen (47) Emmerie u.Eckelen
	(		
	(		
	(Rind	0,12 - 0,60	Brüggemann u.Niesar (46)
	(Schwein	0,05 - 0,55	
	(Schaf	0,04 - 0,4	
Kuh- milch	(Sommer	0,09 - 0,12	Kofler (48)
	(		Kieferle, Seuss u. Schraudy (49)
	(Winter	0,096	
	(Kolostral-	0,087	
	(Periode	0,3 - 0,4	
Leber	(Rind	0,9 - 1,6	Gebauer (50)
	(	0,67 - 5,1	
	(Schwein	0,45 - 3,61	Brüggemann u.Niesar (46)
	(		
	(	0,16 - 0,41	Brazler, Loosli, Krukowski, Maynard (51)
	(		
Fischlebertran		20,0 - 30,0	Brown (52)
Eigelb		50,0 - 100,0	Antoniani, Fedorico, Missiroli (53)

Die Verteilung des Vitamins E in verschiedenen Organen des Kaninchens wurde von Kofler (30) überprüft, der hierfür folgende Werte angibt:

Hirn	0,5	-	1,8 mg % Tocopherol
Lunge	1,0	-	1,9
Herz	0,7	-	1,3
Milz	1,0		
Niere	0,5	-	0,7
Darm	0,4	-	0,7
Magen	0,6	-	1,2
Haut	0,26		
Muskel	0,13	-	0,33
Fett	0,6		

Der Gesamttocopherolgehalt der tierischen Organe, einschließlich des Blutes, und einiger tierischer Produkte läßt sich durch parenteral oder enteral zugeführte Gaben von Tocopherolen erhöhen und ist somit auch abhängig von der Zufuhr mit der Nahrung.

So kam Mason (54) zu dem Ergebnis, daß der Gesamttocopherolgehalt in der Leber der Ratte, wenn der physiologische Bedarf der Tiere 100-fach gedeckt wird, um das 14-fache ansteigt, in den anderen Organen nur 3 - 4-fach.

Werden Kälber mit Vollmilch ernährt, so liegt der α -Tocopherolgehalt der Muskulatur bei 0,096 - 0,17 mg %, während bei Kälbern, die eine Magermilchzufütterung erhalten, der durchschnittliche Gehalt von α -Tocopherol bei 0,052 mg % liegt (55).

Criddle und Morgan (56) konnten durch Fütterung von 32,9 g eines Tocopherogemisches (α -Tocopherol - 50 %) den Gehalt der Organe folgendermaßen steigern:

Leber von 23 auf 225, Herz von 28 auf 145, Muskelmagen von 15 auf 45, Beinmuskel von 11 auf 50, Brustmuskel von 8 auf 25 mg/kg.

Mit der Steigerung des Vitamin E-Gehaltes im Fett ist eine Herabsetzung der Oxydationsempfindlichkeit und dadurch eine Qualitätsverbesserung verbunden. Dies zeigten u.a. Versuche beim Schwein (57, 58) und Truthahn (56).

B. Physiologie des Vitamins E +)

Die Wirkungsweise des Vitamins E im Körper auf eine biochemische Reaktion zurückzuführen, erscheint angesichts der vielfältigen beobachteten Effekte zunächst unmöglich zu sein. Sein eigentlicher Wirkungsmechanismus ist auch heute noch nicht eindeutig geklärt. Ein wichtiger Umstand ist seine weite Verbreitung in allen Körpergeweben (39), welche die Hypothese rechtfertigt, daß es an den Zellstoffwechselvorgängen in allgemeiner Funktion beteiligt ist.

Da das Vitamin E vom tierischen Organismus nicht selbst gebildet wird, ist die Frage der Resorption und die Ausnützung des mit den Nahrungsmitteln zugeführten Vitamins E von besonderer Bedeutung.

Die Resorption des Vitamins E ist wie die der anderen fettlöslichen Vitamine an den Fettgehalt der Nahrung und eine intakte Gallensekretion gebunden (59, 60). Daß der Fettgehalt der Nahrung eine Rolle spielt, wird auch durch die Versuche von Engel (61) bestätigt, der feststellte, daß von einer zugeführten Tocopherolmenge an Ratten nur 31 % mit den Faeces ausgeschieden werden, wenn das Tocopherol in Olivenöl gelöst war, dagegen 87 %, wenn die Verabreichung mit gekochtem Spinat erfolgte. Die Resorption der Tocopherole ist günstiger aus öligem Lösung als aus Pflanzenteilen (62). Daß das α -Tocopherol gegenüber seinen Derivaten in größerem Maße resorbiert wird, bestätigen sowohl Brazler und Mitarb. (51), wie Criddle und Morgan (56). Weiterhin scheint die Resorption von dem Vitamin E-Bedarf des Körpers abzuhängen. So beobachteten Klatskin und Molander (63), daß bei Patienten mit Leberkrankheiten nur noch 35 % der zugeführten Menge gegenüber einem Anteil von 53 - 64 % bei gesunden Personen ausgeschieden wurden. Die Untersucher führen diesen Umstand auf einen erhöhten Bedarf der Organe bei diesen Krankheiten zurück. Daß Resorption und Ausscheidung weiterhin auch vom Angebot abhängen, zeigt ein Versuch an Ratten, die von 3,5 mg eines mit der Nahrung zugeführten Tocopherolgemisches 3 - 15 % mit den Faeces ausschieden, während bei höheren Dosen die Ausscheidungsquote auf 25 % stieg (64).

Von 1 g täglich verabreichtem α -Tocopherol an Hühner werden 77 % in den Faeces ausgeschieden (65). Simon und Milhorst (66) unternahmen Stoffwechselstudien an Kaninchen, denen sie 14-C markiertes α -Tocopherol - succinat verfütterten. Innerhalb von 15 - 20 Tagen

+) Bezüglich der Definition des Vitamins E sei auf Seite 6 verwiesen

fanden sie die gesamten Mengen der Radioaktivität in den Ausscheidungen wieder, und zwar 70 - 80 % in den Faeces und 20 - 30 % im Urin. Bei der im Urin gefundenen radioaktiven Substanz handelt es sich um ein Stoffwechselprodukt des Vitamins E. Als freies Tocopherol wird Vitamin E nicht im Harn ausgeschieden (61). Daß das Vitamin E auch vom Blut in den Darm resekretiert wird, ist von Klatskin postuliert und von Simon und Mitarb. bewiesen worden (67).

Im Körper wirkt das Vitamin E hauptsächlich als Antioxydans. Markees hält dies für die wesentlichste Wirkung des Tocopherols (68), und Kühnau (69) diskutiert die Möglichkeit, daß das Vitamin E seine Wirkungsentfaltung im Körper nur seinen antioxygenen Eigenschaften verdankt. Es wurde sogar eine Namensänderung in "antioxydatives Vitamin" statt "Sterilitätsvitamin" vorgeschlagen (70). Die exsudative Diathese war das erste Beispiel, bei dem ein antioxydativer Effekt des Vitamins E in vivo erkannt wurde (71).

Mit Hilfe dieser Eigenschaft lassen sich **zwanglos** manche Wirkungen des Vitamins E im Körper erklären. Bekannt ist die Tatsache, daß das Vitamin E die Körperfette vor Oxydation, d.h. vor dem Ranzigwerden schützt. Das ist für viele Tierarten nachgewiesen: Für das Schwein (57, 58), bei Küken (72), Truthühnern (56), Ratten (57) und Kaninchen (73). Interessant ist in diesem Zusammenhang, daß auch hier in vivo das α -Tocopherol die größte Wirkung gegenüber seinen Derivaten aufweist, obwohl in vitro die antioxygene Wirkung von α - über β - und γ - zu δ - Tocopherol zunimmt (74). Dieser Umstand findet seine Erklärung darin, daß das α -Tocopherol die größte Speicherung im Körperfett erfährt (57).

Das Vitamin E verhindert durch seine antioxygene Eigenschaft eine Zerstörung des äußerst empfindlichen Vitamins A und Carotins, sowohl im Darm als auch in der Leber (76, 77).

Um antioxydativ wirksam zu sein, müssen die Tocopherole in freier phenolischer Form vorliegen. Die Ester sind bis zu ihrer Hydrolyse inaktiv. Eine überhöhte Konzentration kann zu prooxydativem Effekt führen (71).

Die These, daß das Vitamin E als Antioxydans wirke, wurde durch zwei Tatsachen gestützt, nämlich den Nachweis durch Michaelis und Wollmann (78), daß das Tocopherol Redoxcharakter besitzt, und die Entdeckung, daß es in vielen Fällen zur Behebung von E-Mangelercheinungen durch andere Antioxydantien ersetzt werden kann.

Durch Methylenblau sind die Muskeldystrophie und sogar die Resorptionssterilität und der Abort bei Ratten und Kaninchen zu verhindern, wenn es über sehr lange Zeiträume hinweg verabreicht wird (79, 80).

Es gelingt sogar, bereits eingetretene Sterilität bei der Vitamin E-karenzierten Ratte durch seine chronische Zufuhr wieder zu beheben (81). Weiterhin ist es wirksam bei der Wiederherstellung der Speicherfähigkeit der Leber für Vitamin A nach Vergiftungen (82) und der Verhinderung der Ceroidablagerung (83). Unter Ceroid versteht man ein braunes, fluoreszierendes Pigment, das im Vitamin E-Mangelversuch sowohl im Fett, als auch in der glatten wie quergestreiften Muskulatur auftreten kann (84, 85).

Außer Methylenblau sind noch einige andere Antioxydantien bekannt, die das Auftreten von E-Mangelerkrankungen zu verhindern in der Lage sind. Z.B. schützte Ascorbinsäure Küken vor Encephalomalacie wie Nordihydroguajaretsäure vor exsudativer Diathese. Xantophyll, Thionin und Thiodiphenylamin gewähren einen teilweisen Schutz vor der gelbbraunen Verfärbung des Fettes und der Entfärbung der Schneidezähne bei Nagern (71).

Markees (80) spricht auf Grund der Tatsache, daß ein fettlösliches Vitamin durch einen wasserlöslichen reversiblen Wasserstoffakzeptor, wie ihn das Methylenblau darstellt, ersetzt werden kann, von einem einmaligen Ereignis in der Vitaminologie. Er versucht alle Vitamin E-Mangelerkrankungen mit der Redoxwirkung des Vitamins E im Stoffwechsel zu erklären.

Es wird jedoch auch die Möglichkeit diskutiert, daß noch im Körper vorhandene Vitamin E-Spuren durch die zugeführten Antioxydantien einen Schutz erfahren und letztere nur über diese eine scheinbare spezifische Wirkung entfalten (69, 86).

So scheint das Vitamin E eine spezifische Vitaminwirkung im Verhalten zu den endokrinen Drüsen zu entfalten. Immer wieder wird in der Literatur auf Beziehungen zu Nebennieren und Hypophyse hingewiesen und auf die Tatsache, daß gerade diese beiden Organe besonders reich an Vitamin E sind (38). V. Massenbach und Heinsen sprechen von einer Anregung der Hypophyse durch hohe Vitamin E-Gaben, wodurch es zu einer Stimulierung der körpereigenen Hormonproduktion (87) kommt. Mit Hilfe des "Lipschützchen" Versuches gelang es V. Massenbach und Stadtmüller 1952 auf sehr elegante Weise zu zeigen, daß durch Vitamin E der follikelstimulierende und luteinisierende Faktor des gonadotropen Hypophysenvorderlappenhormons auf ein optimales Maß aufeinander abgestimmt werden und eine zu starke einseitige Überfunktion verhindert wird (88). Auch Berzár (89) berichtet über den stimulierenden Einfluß des Vitamins E auf die Hypophyse und die vermehrte Ausscheidung von Progesteron.

Für eine echte Mehrproduktion von Progesteron durch Vitamin E spricht sich auch Kühnau aus (90). Nach anderen Autoren wirkt Vitamin E hormonsparend, indem es die Wirkung derselben verstärkt (91, 92). In einer weiteren Arbeit gehen dieselben Autoren sogar so weit, das Vitamin E als ein "exogenes Sexualhormon" zu bezeichnen (93).

C. Vitamin E-Mangelercheinungen

Die Erscheinungen, die wir bei unseren landwirtschaftlichen Nutztieren bei Vitamin E-Mangel beobachten, beschränken sich keineswegs nur auf Störungen der Fortpflanzungsfähigkeit, wie von Evans und Burr im Jahre 1922 angenommen wurde und welchem Umstand das Vitamin E seine Bezeichnung als "Antisterilitätsvitamin" verdankt. Heute weiß man, daß Störungen und Schädigungen in allen mesenchymalen Geweben auftreten. So sind solche bekannt für die quergestreifte und glatte Muskulatur, die Herzmuskulatur, das zentrale Nervensystem, die Leber, das Fettgewebe und das Blutgefäßsystem. Ob die Fruchtbarkeitsstörungen auf eine spezifische Vitamin E-Wirkung zurückzuführen sind, oder ob auch hierfür mesenchymale Schädigungen, besonders der Blutgefäße, verantwortlich gemacht werden müssen, - ein Standpunkt, der von Markees vertreten wird -, ist noch nicht entschieden (94).

Die Schäden sind morphologischer, physiologischer und biochemischer Art, wobei eine morphologische Rückbildung der bei Vitamin E-Mangel auftretenden Veränderungen nur selten erfolgt, selbst wenn die Schäden physiologischer oder biochemischer Art beseitigt werden konnten (95).

1) Vitamin E und Fruchtbarkeit

Den Tierarzt interessieren nach wie vor in großem Maße die Störungen bei unseren Haustieren, die mit der Fruchtbarkeit in Zusammenhang **stehen, und** die Möglichkeiten einer Therapie mit Vitamin E.

Die Histopathologie der Schäden, die bei weiblichen Ratten bei experimentellem Vitamin E-Mangel am Genitaltrakt auftreten, ist in der klassisch gewordenen Monographie von Evans und Burr (34) niedergelegt. Die Zeugungsvorgänge verlaufen normal bis zur Implantation des befruchteten Eies, die bei der Ratte etwa am 7. Tag nach der Insemination erfolgt. Einige Tage darauf zeigt sich eine Verzögerung der foetalen Entwicklung, herabgesetzte haemopoetische Aktivität in Dottersack und Leber und eine

Verminderung des der Allantois und dem Embryo zugehörigen mesenchymalen Gewebes. Weiterhin kommt es zu einer Störung des Blutkreislaufes in der Plazenta durch mangelhafte Entwicklung der foetalen und placentaren Blutgefäße (96), ein Umstand, der zu Asphyxie, Verkümmern und Tod des Foetus führt. Nun folgen rasch Nekrose und Resorption des Foetus unter den Erscheinungen mehr oder weniger persistierender leichter Uterusblutungen und regressiven Abbaus der Placenta.

Die Foetalresorption kann verhindert werden, wenn eine ausreichende Menge Vitamin E während der ersten Woche der Trächtigkeit verabreicht wird. Falls die Dosierung nicht ganz ausreichend ist, können sowohl tote, als auch lebende Früchte ausgetragen werden. Letztere leben jedoch selten länger als einige Tage (97).

Tod und Resorption der Foeten können auch bei der Maus (98) und beim Hamster (99) im Vitamin E-Mangelversuch beobachtet werden.

Bei Ratten, die ein Jahr oder länger Vitamin E-arm ernährt wurden, treten keine Änderungen im Auftreten des Östrus, der Ovulation, der Befruchtung des Eies, seiner frühen Entwicklung oder seines Transportes durch den Eileiter auf (100).

Morphologische Veränderungen konnten am Eierstock der Ratte nicht festgestellt werden, wohl aber bei der Maus, bei der ein Vitamin E-Mangel in verminderter Ausbildung der Primordial-Eier, weniger interfolliculärem Gewebe, kleineren aber zahlreicheren Corpora lutea und Abwesenheit von Neutralfett resultiert (101). Über Veränderungen von Ovarien anderer Tierarten ist nichts bekannt.

Histologisch lassen sich folgende Vorgänge am Uterus beobachten:

Pigmentgranula, die zuerst an beiden Polen des Zellkerns auftreten, drücken die Myofibrillen mehr und mehr **auseinander**, sodaß sie nur schwer von dazwischenliegenden, pigmentbeladenen Makrophagen zu unterscheiden sind. Letztere werden zahlreich und deutlich im intramuskulären Bindegewebe und in der äußeren Zone des Endometriums sichtbar (102). Diese Veränderungen führten zu fibröser Einschmelzung des Uterusgewebes, die für die Fortpflanzungsstörungen verantwortlich ist (103, 104). Durch Vitamin E-Gaben an die avitaminotischen Rattenmütter kann die Sterilität verhütet

oder geheilt werden. Die Wirkung der Therapie hängt weitgehend vom Zeitpunkt der Verabreichung im Bezug auf die eingetretene Schwangerschaft ab. Je früher die Therapie durchgeführt wird, umso besser sind die Erfolge. Setzt die Therapie erst im Mittelstadium der Schwangerschaft ein, so wird nur ein Teil der Foeten und diese mit ausgeprägten Skelettmißbildungen geboren. Die Abnormitäten bei den Foeten betreffen das weiche und knöcherne Gewebe. Als Skelettmißbildungen kommen völliges oder teilweises Fehlen von Knochen, verzögerte Verknöcherung, Verkrümmung der Wirbelsäule und Verschmelzung von Rippen (104, 105, 106) vor.

Verhältnismäßig früh wurde die Bedeutung des Vitamins E für die Fruchtbarkeit der Hühner entdeckt. Bei vitamin E-armer Ernährung legen die Hühner Eier, in denen die Embryonen bei der Bebrütung schon frühzeitig absterben. Es kommt auch hier zu Schädigungen und Degeneration des Zirkulationsapparates, die zum Fruchttod führen. Durch vorherige Vitamin E-Gaben an die Legehennen ist dieses zu verhindern (107, 108).

Bei der Ratte treten im frühen Stadium der E-Avitaminose schwere und irreparable Schädigungen der Hoden ein, die mit dem Erlöschen jeglicher sexuellen Funktion, einem der Kastration ähnlichen Zustand, enden. Bereits 4 - 8 Wochen nach Beginn der vitamin E-freien Ernährung finden sich degenerativ veränderte nicht mehr befruchtungsfähige Spermatozoen im Ejakulat. Azoospermie, Atrophie der Samenkanälchen, Schwund der Spermatidenkerne mit Riesenzellbildung und Verflüssigung folgen. Das Gewicht des Hodens geht auf 1/3 zurück (109). Das Hodenzwischengewebe und die Sertolischen Zellen erleiden keine Veränderungen, ein Befund, der im Hinblick auf das völlige Erlöschen des Geschlechtstriebes und das Erscheinungsbild eines Kastraten überrascht, da doch die Hodenzwischenzellen als Produktionsstätte für das männliche Keimdrüsenhormon angesehen werden (110).

Nach Curto (111) entstehen beim Meerschweinchen bei Anwendung einer geeigneten Vitamin E-Mangeldiät dieselben Hodenveränderungen, die bei der Ratte beobachtet werden. Auch hier bleiben die interstitiellen Zellen erhalten. Durch entsprechende Zufuhr von Vitamin E können diese Schäden verhindert werden (112).

Beim Hamster kommt es ebenfalls zu einer progressiven Degeneration der Testes unter fortgesetztem Vitamin E-Mangel. Die ersten Anzeichen zeigen sich nach 75 Tagen; fortgeschrittene Stadien werden nach 150 Tagen beobachtet. Es kommt zu einer ausgesprochenen Anhäufung von säurefestem Pigment im Sertolizellverband und dem interstitiellen Gewebe. Die histolo-

gischen Veränderungen des Keimepithels gleichen nicht den bei Ratten beobachteten. Im Gegensatz zu den irreversiblen Schädigungen bei der Ratte erfährt das Keimepithel beim Hamster nach einer Vitamin-E-Therapie eine allmähliche Besserung. Als weitere Wirkung ist der erneute Zufluß von Spermien in die Gänge des Nebenhodens (113) zu beobachten.

Vitamin E-Mangelsymptome sind bei unseren großen Haustieren mit Ausnahme für das Schwein (114) nicht bewiesen. Berthe (70) stellt nach Vergleich verschiedener Arbeiten fest, daß eine Störung der Fortpflanzung durch Vitamin E-Mangel zumindest nicht bei allen Tieren nachweisbar sei. Gullickson und Mitarb. fütterten 22 weibliche Rinder einschließlich der nachfolgenden 4 Generationen mit einer vitamin E-armen Diät. Östrus und Ovulation verliefen normal, die Kälber besaßen Durchschnittsgröße und zeigten unveränderte Lebenskraft. Die Verfasser kommen zu dem Schluß, daß das Rind und die anderen Wiederkäuer kein Vitamin E für die Prozesse der Fortpflanzung benötigen (115). Ähnliche Ergebnisse erzielte Underbjerg (116) bei Ziegen, die nach Verabreichung einer Vitamin E-Mangeldiät über 4 1/2 Jahre lang keine Fortpflanzungsstörungen zeigten.

2) Vitamin E und Muskelschädigungen

Schäden der Skelettmuskulatur

Die Berichte über Schäden an der Muskulatur nehmen heute im Rahmen der Erforschung der Folgen eines Vitamin E-Mangels in der internationalen Literatur eine Vorrangstellung ein. Der erste Bericht, mit dem gewisse Muskelschäden mit Vitamin E-Mangel in Zusammenhang gebracht werden, stammt von Evans und Burr aus dem Jahre 1928 (109). Danach entwickeln sich bei jungen Ratten, deren Mütter vitamin E-frei ernährt wurden, gewöhnlich zwischen dem 18. und 25. Tag neuromuskuläre Störungen. Als erste Symptome werden Trägheit und eine gewisse Ungeschicklichkeit beobachtet. Die Tiere sind nicht mehr imstande, sich von der Rückenlage selbst wieder in die Bauchlage zu drehen. Später werden die Vorderpfoten gekrümmt gehalten, die Hinterextremitäten zeigen Parese oder auch völlige Paralyse. Im Endstadium werden die Tiere apathisch, die Körpertemperatur und Atmung werden herabgesetzt, und schließlich tritt der Tod ein. Durch eine rechtzeitige Verabreichung von Vitamin E bis zum 15. Lebenstag, kann ein Auftreten der Erscheinungen verhindert werden. Zeigen sich bereits Symptome einer Lähmung, so besitzt das

Vitamin E keine oder nur geringe therapeutische Wirkung (104, 117, 118).

Ähnliche Ergebnisse erzielte Anderson mit Hundewelpen (119). Daß für das Zustandekommen der Krankheit das Fehlen eines Faktors in der Milch der Mütter verantwortlich war, konnten Evans und Burr dadurch zeigen, daß die Jungen gesunder Rattenmütter von den vitamin-E-arm ernährten Muttertieren aufgezogen, die Krankheitssymptome entwickelten, während umgekehrt die Jungen der vitamin E-arm ernährten Muttertiere nicht erkrankten, wenn sie von normal ernährten Rattenmüttern aufgezogen wurden (109).

Bereits lange Zeit vor einer Manifestierung klinischer Symptome wird die Muskeldystrophie durch eine starke Kreatinausscheidung im Harn angezeigt. Sie ist eine Folge des Versagens der Phosphokreatinsynthese. Die tiefgreifenden Störungen des Muskelstoffwechsels führen schließlich zu den charakteristischen degenerativen Veränderungen (120, 121).

Die makroskopischen Veränderungen (122, 123, 124) äußern sich darin, daß die Skelettmuskulatur blaß, ischämisch und feucht wird. Gelegentlich zeigt sie einen grauen Schimmer und ist leicht grieselig infolge von Kalk-einlagerungen. Oft erinnert sie in ihrem Aussehen an gekochtes Fleisch.

Mikroskopisch zeigt sich eine "systemartige Schädigung" der muskulären Elemente sowohl der Skelettmuskulatur als auch der glatten und Herzmuskulatur, wobei die Veränderungen an der quergestreiften Muskulatur auch heute noch als die ersten erfaßbaren Auswirkungen eines Vitamin E-Mangels bei der Ratte gelten (125). Die quergestreifte Muskulatur zeigt wachsartige Degeneration, ausgebreitetes interstitielles Ödem, leukozytäre Infiltration und teilweise ein Zerreißen der Muskelfasern unter Pigmentablagerung. Die betroffenen Segmente zeigen zuerst Veränderungen an den Muskelkernen in Form von Größenunterschieden, Ausbildung von Riesenkernen, Einschnürungen und amitotischer Proliferation (73). Später folgen Verlust der Querstreifung, hyaline Nekrose der fibrillären Substanz, Kernzerfall, Zerreißen der Sarkolemmschläuche und Beseitigung der Trümmer durch eindringende Makrophagen. In den zellreichen Bezirken, die den Ort des Faseruntergangs markieren, zeigen sich viele basophile, fusiforme oder bandartige Streifen mit zentral gelagerten Kernen, die junge regenerierende Fasern repräsentieren. Die Fähigkeit der Regeneration geht in zunehmendem Maße verloren (123, 125). Häufig beobachtete normale Faserbezirke an der Peripherie des Muskels lassen vermuten, daß die Nähe guter Gefäßversorgung den dystrophischen Prozeß aufhält (126).

Die von Evans und Burr (109) beschriebenen Muskelveränderungen bei der jungen Ratte können durch geeignete Diät auch bei erwachsenen Ratten (127) und anderen Tierarten hervorgerufen werden.

Sie wurden beschrieben bei:

Meerschweinchen (128), Kaninchen (129), Küken (130, 131), Enten (132), Hunden (133), Rhesusaffen (134), Lämmern (135) und Kälbern (136).

Verschiedene Faktoren scheinen die Mangelerscheinungen zu fördern, wie z.B. Trächtigkeit und Laktation (133), Coccidiose bei Kaninchen (129) oder massive Coliinfektion bei Enten (132).

Nach Blaxter (137) ist ungewohnte Muskularbeit ein wichtiger Faktor, um bei Rindern und Schafen die Krankheit auszulösen. Hierzu hat Pappenheimer einen interessanten Versuch angestellt: Junge Ratten vitamin E-arm ernährter Muttertiere zeigen gewöhnlich gegen den 18. Tag post partum Symptome einer Muskeldystrophie. Pappenheimer trennte einzelne Muskeln von ihrer Sehne und ihren Nerven und erreichte dadurch eine Ruhigstellung. Es traten keine Dystrophieerscheinungen auf (138).

Das gehäufte Auftreten natürlicher Muskelkrankheiten bei unseren Haustieren, besonders Schafen, Rindern und Pferden legt nach Blaxter die Vermutung nahe, daß viele von ihnen eine gemeinsame Aetiologie haben; besonders da sie sich meist in Gegenden mit sehr strengen Wintern finden, in denen die Tiere entsprechend lange aufgestallt sind (139).

Die natürlich vorkommenden Muskeldystrophien gleichen den experimentell durch einen Vitamin E-Mangel oder einen Überschuß an ungesättigten Fettsäuren in der Diät hervorgerufenen Symptomen, und es besteht kein Zweifel, daß dabei ein Vitamin E-Mangel beteiligt ist (140, 141). Die Erkrankung der Kälber ist bekannt unter dem Namen "white muscle disease", die der Lämmer als "stiff lamb disease" (140, 142, 143). Die Gegenwart von Muskeldystrophie als pathognomonisch für alleinigen Vitamin E-Mangel zu betrachten, ist jedoch nicht gerechtfertigt (139).

Nach den oben angeführten Arbeiten ergibt sich zusammenfassend folgender Symptomenkomplex, wobei das Bild sich mit den jeweils im einzelnen betroffenen Muskeln ändert: Steifheit der Gliedmaßen, Unfähigkeit den Kopf zu heben und zu saugen, gestörte Bewegung, die sich in symmetrischer Lahmheit und rotierender Bewegung der Sprunggelenke beim Gehen äußert. Lämmer zeigen einen steifen "Marschierschritt". Oft können sie überhaupt nur wenige Minuten unter heftigem Zittern infolge von Überanstrengung

der erkrankten Muskeln stehen. Der Gesichtsausdruck der Tiere ist gespannt, Die Muskeln selbst bei der Palpation hart und gelegentlich stark geschwollen. Rasch kommt es zu Entkräftung. Sind die Zwerchfellmuskeln betroffen, so wird Pneumonie vorgetäuscht, wobei die Atmung fast ausschließlich von der Bauchwand getragen wird. Der Tod tritt in 2 - 7 Tagen durch Kräfteverfall und Atemnot ein. Die Schäden am Herzmuskel führen oft plötzlich und ohne vorherige warnende Anzeichen zum Tod (143).

Bei der Obduktion fällt die Farbe der Muskulatur auf, die oft ein gekochtes Aussehen hat. In der Lunge bestehen passiver Blutandrang und Ödem, im linken Ventrikel und Septum des Herzens finden sich akute degenerative Veränderungen.

Die histologische Untersuchung zeigt, daß sich die Veränderungen auch auf die Schlund-, Zungen- und Kaumuskulatur erstrecken. Die Befunde stimmen im übrigen mit den bei der experimentellen Muskeldystrophie gefundenen überein.

Die Veränderungen am Herzmuskel sind ebenfalls von vielen Autoren und bei fast allen Laboratoriumstieren und Haustierarten beschrieben. Sie ähneln sehr den Veränderungen, die bei der quergestreiften Muskulatur beobachtet werden. In der Hauptsache finden sich hyaline Nekrose mit fibrösem Ersatz des zugrundegegangenen Gewebes und Narbenbildung. Es liegen Berichte vor für die Ratte (73, 144), das Kaninchen (145, 146), das Meerschweinchen (145), das Kalb (147), das Rind (148, 149), das Schaf (135, 150) und die Ziege (145).

Besonders rasch entwickeln sich die Schäden im Herzen der Pflanzenfresser (Meerschweinchen, Schaf, Rind), wo sie oft zu plötzlichem Tod durch Myocardinfarkt (143) führen. Bei anderen Tieren (Ratte, Hamster) können die Schäden extensiver Herdnekrose und Myocardvernarbung neben Pigmentanhäufung monatelang ohne klinische Auswirkung bestehen. Ob die besonders von deutschen Autoren beschriebenen histopathologischen Veränderungen am Herzen von Schweinen, die an "plötzlichem Herztod" gestorben sind, auf einen Vitamin-E-Mangel zurückgeführt werden können, ist bisher nicht erwiesen. Jedenfalls ähneln die Erscheinungen stark denen, die bei anderen Tieren unter experimentellem Vitamin E-Mangel gefunden werden (151).

Englische Autoren berichten über eine Krankheit bei Schweinen, die sie als "fatal syncope" bezeichnen. Diese Krankheit wird auf Vitamin E-Man-

gel zurückgeführt und ist möglicherweise mit dem in Deutschland auftretenden "plötzlichen Herztod" identisch (143). Die dabei von Gullickson beschriebenen elektrokardiographischen Veränderungen wird der Tierarzt in der Praxis kaum feststellen können (152).

Die mikroskopisch beobachteten Veränderungen am Uterus dürfen als Beispiel für die gesamte glatte Muskulatur gelten. Sie wurden im Kapitel über Fruchtbarkeitsstörungen beschrieben (102, 103). Nach Mason und Emmel zeigen sich die Veränderungen außer am Uterus an Eileiter, Samenbläschen, Prostata, Ductus deferens, Dünndarm, Bronchien und Venen (144). In der Lunge kommt es durch Schädigung der muskulären Elemente zu schweren Funktionsstörungen. Die Schädigung der glatten Muskulatur führt zunächst zu einer Wandverdünnung der Bronchioli, an die sich eine deutliche Blähung anschließt. Die muskuläre Wand kann völlig durch fibröses Narbengewebe ersetzt sein, sodaß die Fähigkeit der Kontraktion verloren gegangen ist. Infolge der Erweiterung der Bronchien wird auch das Bronchialepithel zu einer dünnen Schicht kubischer Zellen umgeformt. Atemnot ist die Folge dieser Veränderungen (152).

3) Das Vitamin E und Leberschäden

Das Vitamin E spielt bei verschiedenen histopathologischen Veränderungen der Leber eine Rolle, jedoch geht aus den Berichten übereinstimmend hervor, daß nicht der Vitamin E-Mangel allein die Schäden hervorruft, sondern erst im Zusammenhang mit verschiedenen anderen Nahrungsfaktoren.

Im Jahre 1939 berichteten György und Goldblatt (153) über einen Versuch mit einer vitamin B-freien Diät, mit der sie bei jungen Ratten in etwa 18 % der Fälle eine Lebernekrose erzeugen konnten. Bei 4 von 300 Tieren beobachteten sie eine ausgedehnte Fibrose in der Leber. Die Lebernekrose trat unter anscheinend völlig gleichen Versuchsbedingungen nicht regelmäßig auf und ließ sich nicht willkürlich auslösen. Für die Beteiligung infektiöser oder toxisch exogener Faktoren an den Leberschäden ließ sich zunächst kein Beweis erbringen. Jedoch ging aus verschiedenen Versuchen hervor, daß eine zu geringe Proteinzufuhr dafür verantwortlich sein könnte, was um so wahrscheinlicher erschien, als der Schutzeffekt des Proteins auf die Leber sich schon in toxikologischen Studien mit Chloroform gezeigt hatte. Daß bei niedrigem Gehalt an Protein in der Diät Leberschäden regelmäßig auftreten, konnte bald von György (155) und

etwas später auch von Schwarz (156) gezeigt werden. Letzterer weist darauf hin, daß der Mangel an Cystin oder Methionin der im Protein enthaltenen wichtigen schwefelhaltigen Aminosäuren für die Entwicklung akuter massiver und zonaler Nekrose nicht ausreichend sei. In seinen Studien wird Tocopherol als "Nahrungsschutzfaktor" in der Aetiologie der Lebernekrose bezeichnet.

Im Hinblick auf die Entwicklung akuter diffuser Lebernekrose, vermag Tocopherol das Fehlen von Cystin oder Methionin zu kompensieren und umkehrt.

Diese Mitteilungen finden später durch Hinsworth ihre Bestätigung (157). Durch eine zweimalige Beigabe von 15 - 20 mg α -Tocopherol pro Tier und Woche konnte er das Auftreten von Lebernekrose bei Ratten verhindern, die mit einer Diät gefüttert wurden, die bei Kontrolltieren Lebernekrose erzeugte. Von Bedeutung war dabei die Tocopherolzufuhr vor Versuchsbeginn. Eine reichliche Tocopherolzufuhr zu diesem Zeitpunkt verzögerte die Ausbildung von Nekrosen. Andererseits wird diese beschleunigt, wenn während der Versuchsdauer eine Trächtigkeit besteht (158). Von Interesse ist dabei, daß bei Foeten, die aus dem Uterus an Lebernekrose sterbender Ratten entwickelt wurden, keine Leberschäden beobachtet werden konnten. Von Einfluß ist weiter die Qualität des in der Diät enthaltenen Fettes. So fördern Lebertran und in einigem Abstand auch Speck stark die Entwicklung der Nekrosen durch ihren hohen Gehalt an ungesättigten Fettsäuren. Wird an Stelle von Lebertran oder Speck Butterfett gefüttert, das praktisch vitamin E-frei ist, gleichzeitig jedoch arm an ungesättigten Fettsäuren, so ist die Ausbildung akuter Nekrosen weit geringer (159).

Wird Cystin im Übermaß der physiologischen Dosis verabreicht, so kann es die Bildung massiver Lebernekrose nicht verhindern, sondern fördert sogar ihre Entwicklung, eine Erscheinung, die vielleicht auf eine Störung des normalen Cystin : Cholin Verhältnisses in der Diät und im Körper zurückzuführen ist (160).

Hove und Mitarb. (161) beobachteten bei Verabreichung einer Vitamin-E-Mangeldiät, die gleichzeitig arm an Cystin ist, neben schweren Leberschäden das Auftreten massiver Lungenhaemorrhagien. Beide Symptome ließen sich durch Vitamin E-Zufuhr verhindern.

Schwarz entdeckte 1951 noch eine weitere Substanz, die am Zustandekommen akuter oder massiver Haemorrhagie und Nekrose in der Leber beteiligt ist, die er ursprünglich als "Faktor 3" bezeichnete (162) und die heute als Selen identifiziert ist.

Zur Verhinderung der Schäden bedarf es nach Matet einer Zufuhr von 0,4 % Methionin bzw. 0,0125 % Tocopherolacetat zur Diät (163), während Schwarz 0,2 - 1 % Cystin in der Diät wirksam fand. Vom Vitamin E berichtet er, daß es gewichtsmäßig nahezu 800 x so wirksam sei wie das Cystin, während er den "Faktor 3" dem Vitamin E in seiner Wirkung vergleichbar findet (164).

Makroskopisch gesehen ist die Leber leicht geschwollen. Die Oberfläche ist glatt und zeigt marmoriertes Aussehen durch helle und dunkle Flecken, die bei Ratten bis zu 1 cm² Ausdehnung zeigen, oder sie ist gleichmäßig lehmgelb oder rosa verfärbt (161, 156). Es sind alle Lappen betroffen. Das Lebergewicht ist im Verhältnis zum Körpergewicht gegenüber Kontrolltieren etwas erhöht.

Histologisch zeigt sich hochgradige degenerative Verfettung und Erweiterung des Sinus, Ruptus von Kapillaren, Einlagerung eines typischen Pigmentes (Ceroid) und atrophische Veränderungen der Zellkerne des Leberparenchyms. Der Karyolyse gehen häufig Granulabildungen im Zellplasma voraus, das im Spätstadium gelegentlich mit Kalk inkrustiert erscheint (161, 156, 165).

Die Nekrosen liegen meist direkt unter der Leberkapsel und sind zentrilobulären Ursprungs.

In der Praxis kommt eine diesen Erscheinungen vergleichbare Krankheit, die toxische Leberdystrophie, bei Pferd, Rind, Schaf, Schwein und Hund vor (151). Es konnte auch bewiesen werden, daß sie beim Schwein mit der Verfütterung ranzigen Lebertrans zusammenhängt (166, 167), und Mangel an schwefelhaltigen Aminosäuren und Vitamin E dafür mitverantwortlich sind (168).

Unter Vitamin E-Mangel sinkt der Gehalt der Leber an Vitamin A (76, 77) und an Glykogen (169, 170). Andererseits kann die Glykogenverarmung der Leber durch Vitamin E verhindert werden, weshalb es als "Leberschutzstoff" empfohlen wird (170, 171).

Die Ceroidbildung in der Leber, die bei Vitamin E-Mangel (172) oder reichem Gehalt der Diäten an ungesättigten Fettsäuren (173) auftritt, und auch von Ruppel (73) beschrieben wurde, kann durch Vitamin E-Zufuhr verhindert werden (174).

Nach György dagegen soll α -Tocopherol selbst in so hohen Dosen wie 30 mg täglich die Ceroidbildung bei Ratten nicht verhindern können, sondern nur die entstehende Menge etwas reduzieren (159).

Eine Vergiftung mit Tetrachlorkohlenstoff führt bei Ratten zu einer Leberverfettung, die durch Tocopherolzufuhr günstig beeinflusst werden kann. So kommt es unter Tocopheroleinfluß zu einem verstärkten Abbau von Neutralfetten. Diese Wirkung wird über eine Steigerung der Phosphatidsynthese durch das Vitamin E erklärt. Auf diesem Wege werden dem Vitamin E "lipotrope" Fähigkeiten zugeschrieben, ohne daß damit jedoch der Angriffspunkt im Fettstoffwechsel bei Tetrachlorkohlenstoffvergiftungen geklärt wurde (171, 175).

4) Das Vitamin E ⁺) in der Therapie verschiedener Haustierkrankheiten

Im Verhältnis zu der großen Zahl der Veröffentlichungen über das Vitamin E in der internationalen Literatur sind Berichte mit genauen Dosierungsangaben zur Therapie der verschiedenen Krankheitszustände relativ selten zu finden.

Es ist verständlich, daß die historisch zunächst aufgezeigte Beziehung des Vitamins E zur Sterilität der Ratte und die kurzartige Wirkung des Vitamins E bei experimentell erzeugter Sterilität (35) dem Kliniker Anlaß gab, in umfangreichen Versuchen bei der Behandlung der primär nicht infektiösen Sterilitäten Vitamin E als Therapeutikum einzusetzen, zumal man die Ursachen dieser Erkrankung zum Teil in einer Vitamin E-Mangellage des Organismus zu erkennen glaubte.

Inzwischen ist es gelungen nachzuweisen, daß ein niedriger Vitamin E-Gehalt im Blut weder für die Trächtigkeit oder die Geburt lebensfähiger Kälber (176), noch für die Gesamtlage der Vitamin E-Versorgung des Körpers von Bedeutung ist (177).

Weiterhin wurde gezeigt, daß Vitamin E-Entzug für lange Zeit, selbst über 4 Generationen hinweg, die Fortpflanzungsfähigkeit weder der weiblichen noch der männlichen Rinder beeinträchtigt (115), und daß in keinem einzigen Fall einer Zyklussterilität bei 100 Kühen ein Mangel an Vitamin E vorlag (3).

Diese Befunde berechtigen zu der Annahme, daß die in der tierärztlichen Praxis beobachteten Heilerfolge bei Fruchtbarkeitsstörungen nach Applikation

⁺) Bezüglich der Definition des Vitamins E sei auf Seite 6 verwiesen

von Vitamin E-Präparaten nicht auf dem Wege über eine ausreichende Versorgung eines an diesem Wirkstoff verarmten Organismus zu erklären sind. Schon Markees wies darauf hin, daß die Vitamin E-Therapie keinen Ausgleich eines entsprechenden Mangels darstelle, sondern im Sinne einer pharmakodynamischen Wirkung an den Geweben und im Stoffwechsel angreife (94).

Die Funktion des Vitamins E wird heute über seine günstige Wirkung auf die Blutgefäße der Placenta und die Kapillarpermeabilität (178), seine Bedeutung für die Sauerstoffversorgung des Embryo (179) und seinen Synergismus zu den Sexualhormonen erklärt (180, 181).

In diesem Sinne wird das Vitamin E heute prophylaktisch und kurativ bei unseren Haustieren angewendet, und die gute Wirkung kann nicht geleugnet werden, wenn auch auf fast allen Anwendungsgebieten von einzelnen oder mehreren Autoren Mißerfolge gemeldet werden oder eine günstige Wirkung in Abrede gestellt wird. Es muß vor allem darauf hingewiesen werden, daß es kein Sterilitätsallheilmittel ist (182).

Prophylaktisch wird es erfolgreich angewendet, um drohenden Abort zu verhindern, besonders auch in Herden, die mit Abortus Bang infiziert sind (183, 184). In Herden, in denen große Ausfälle durch Sterilität auftreten, erhöht es den Prozentsatz der Trächtigkeiten (185, 186).

Bei Mutterschweinen begünstigt es die Aufzuchtquote der Jungen (187), jedoch ist es nötig, das Vitamin E vor der Konzeption zu verabreichen.

Kurativ wurde es von Vogt-Möller und Bay schon vor 1931 in großem Umfange eingesetzt. Die Autoren erzielten so gute Ergebnisse bei der Sterilitätsbehandlung der Rinder, daß sie zu weiteren Versuchen anregten (188).

Weiterhin wird über gute Erfolge bei der Behandlung von symptomloser Sterilität, cystöser Entartung der Eierstöcke, Umrindern und stiller Brunst berichtet (180 - 83, 189, 190). Die Angaben über die Dosierung schwanken dabei zwischen 150 und 600 mg Tocopherol in öliger Lösung pro Tier bei intramuskulärer Applikation.

Prophylaktisch sind 100 mg α -Tocopherol jeden zweiten Tag verabreicht nötig, um bei Lämmern das Auftreten von Muskeldystrophiesymptomen im Vitamin E-Mangelversuch zu verhüten.

Für die Therapie der Muskeldystrophien werden die in folgender Tabelle zusammengestellten Dosierungsangaben empfohlen:

Tierart	Dosierung	Literatur
Lämmer	300 mg Tocopherol 3x in Abständen von 1 - 5 Tagen	March (191)
	500 mg, dann 100 mg jeden 2. Tag bis zur Heilung	Culik u. Mitarb. (141)
	150-300 mg 5 - 7 Tage tägl.	Vawter (192) Trevino (142)
	500-800 mg 2 - 3 Tage tägl.	Klussendorf (140)
Kälber	750 mg Tocopherol- gemisch als einmalige Gabe	Vawter (192)
		Trevino (142)

Zusammenfassend läßt sich folgern, daß wahrscheinlich die therapeutische Wirkung des Vitamins E auf einen pharmakodynamischen Effekt zurückzuführen ist. Dieser wird von der zu erreichenden Gewebskonzentration an Vitamin E abhängig sein. Da zu erwarten ist, daß eine intravenöse Injektion im Gegensatz zu einer intramuskulären Injektion zu einer rascheren und höheren Anflutung führt, über deren Ausmaß nichts bekannt ist, sollte in der vorliegenden Arbeit festgestellt werden, ob die intravenöse Injektion klar wasserlöslich emulgierter Präparate gegenüber der bisher angewandten intramuskulären Injektion öligler Wirkstofflösungen, hinsichtlich eines rasch zu erreichenden, ausreichend hohen und lang anhaltenden Gewebsspiegels Vorteile bieten könne. Gleichfalls sollte eine mögliche Überlegenheit des veresterten Tocopherols, nämlich des Tocopherolacetats, gegenüber dem unveresterten Tocopherol untersucht werden.

III. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

A. Prinzip der Versuchsanstellung

Etwa gleich schweren Ratten der Sprague-Dawley-Zucht wurden 3 mg d,l- α -Tocopherol bzw. d,l - α -Tocopherolacetat intravenös bzw. intramuskulär in ölicher oder emulgierter Lösung appliziert. In Abständen von der Zeit wurden die Tiere einzeln getötet und mittels chemischer Bestimmungsverfahren die Vitamin E-Gehalte in 14 verschiedenen Organen ermittelt.

B. Prinzip der chemischen Vitamin E-Bestimmung

Die organische Substanz wird heiß mit Kalilauge verseift. Das Unverseifbare wird durch Ausschütteln mit Petroläther extrahiert. Die petrolätherische Lösung wird auf dem Wasserbad eingengt und die anwesenden Carotinoide durch Antimontrichlorid zerstört. Nach Aufnehmen des Rückstandes in Petroläther werden vorhandene störende Substanzen durch Chromatographie an Aluminiumoxyd entfernt. Die Tocopherole werden mit Benzol eluiert. Die benzolische Lösung wird abdestilliert, der Rückstand in Alkohol aufgenommen und die Tocopherole durch Zusatz von Eisen-III-Chlorid oxydiert. Das dabei entstehende Eisen II Salz wird mittels α - α' -Dipyridyl kolorimetrisch quantitativ bestimmt (31).

C. Reagentien

1) Organaufarbeitung

Äther DAB 6

Äthylalkohol, 96 %ig, rein

Al_2O_3 nach Brockmann, frisch

3 Stunden bei 400 ° geglüht
und durch Zugabe von 12 % H_2O
desaktiviert.

Aqua dest.

Benzol, p. a.

Methanol, p. a.

10 %ige methanolische KOH

5 %ige wässrige KOH

10 %ige wässrige Na-Ascorbinatlösung

Petroläther Sdp. 30 ° - 50 ° C

(destilliert)

Petroläther Sdp. 30 ° - 50 ° C

(wassergesättigt)

SbCl_3 -Lösung - (22 g SbCl_3 in 100 ccm
Chloroform)

Seesand geglüht

2) Kolorimetrische Bestimmung

Äthylalkohol, 96 %ig, rein,

Benzol, p. a.

0,5 %ige Lösung von α - α' -Dipyridyl. p. a.

in Äthylalkohol, 96 %ig, rein

0,2 %ige Lösung von Ferrichlorid p. a.

($\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$) in Äthylalkohol

96 %ig, rein

D. Aufstellen einer Eichkurve

- 1) Durch Auflösen von 10 mg reinen dl - α - Tocopherols der Firma La Roche, Basel, in 100 ccm absoluten Äthylalkohols, wird eine Stammlösung hergestellt, von der 1 ccm 0,1 mg (= 100 μ) Tocopherol enthält.

- 2) Herstellung eines Reagenzgemisches nach Emmerie und Engel (31):

zu 10 ccm Benzol werden nacheinander 1 ccm einer 0,2 %igen alkoholischen FeCl_3 -Lösung, 1 ccm einer 0,5 %igen alkoholischen α - α' -Dipyridyllösung und 13 ccm Äthylalkohol gegeben. Das Gemisch wird jeweils frisch hergestellt und in einer braunen Flasche lichtgeschützt aufbewahrt.

- 3) Steigenden Mengen (0,1 - 1,0 ccm) der Stammlösung, werden fallende Mengen (4,9 - 4,0 ccm) des Reagenzgemisches zugesetzt. Auf diese Weise entstehen jeweils 5 ccm eines Reaktionsgemisches mit steigender Vitamin E-Konzentration (siehe Tabelle). Das Gemisch wird 3 Minuten in dunklem Raum stehen gelassen. Während dieser Zeit färbt sich das Reaktionsgemisch durch Bildung eines Dipyridyl-Eisen-II komplexes je nach Tocopherolmenge mehr oder weniger rot.

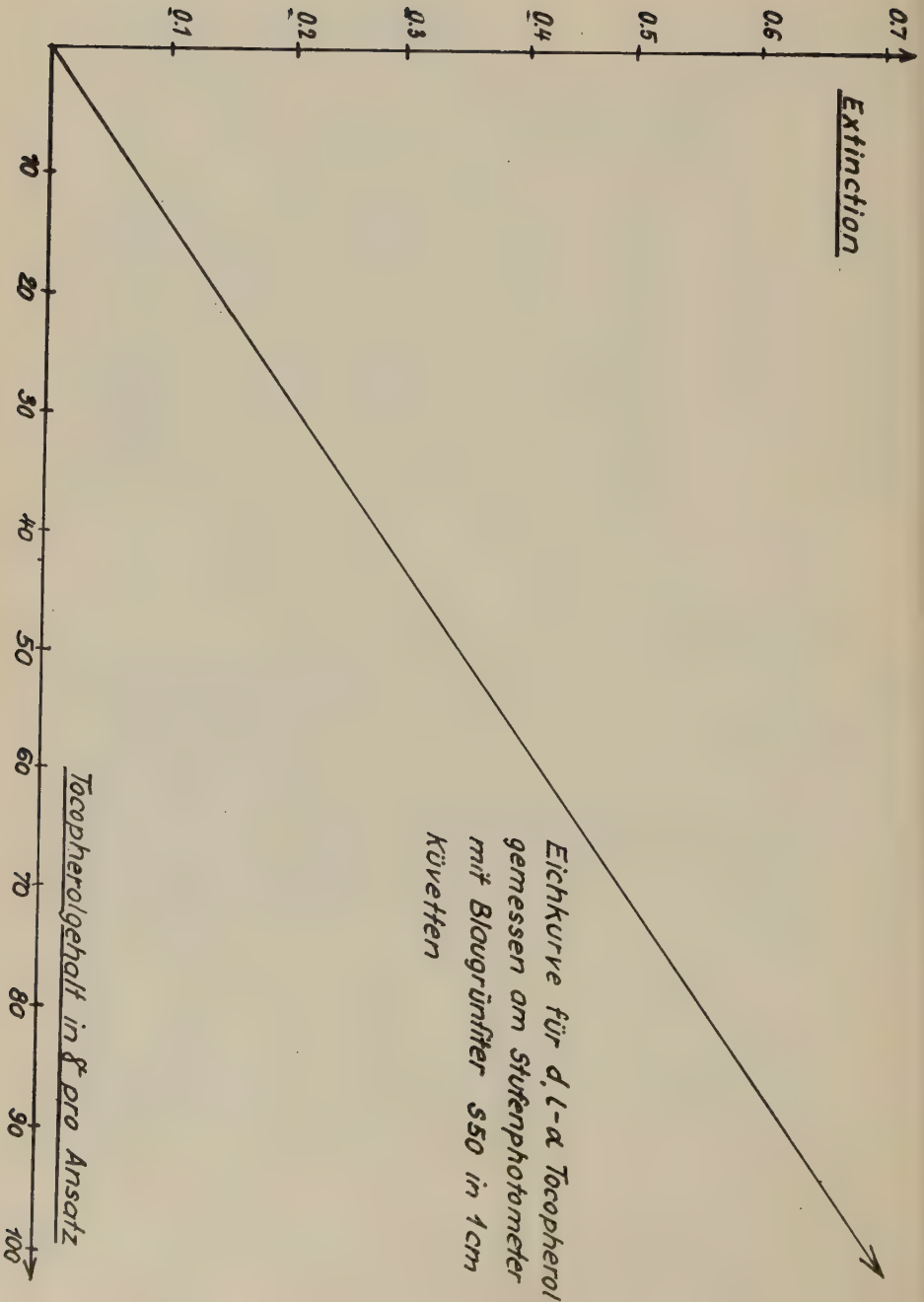
- 4) Die Messung des Farbwertes erfolgt im Stufenphotometer in 1 cm Küvetten bei Filter S 50. Die Vergleichsküvette wird mit dem Reagenzgemisch gefüllt. Die gefundenen Extinktionswerte werden auf Koordinatenpapier eingetragen und die erhaltenen Punkte durch eine Gerade miteinander verbunden. Diese Gerade gilt als Eichkurve und liegt der Auswertung der bei den Organuntersuchungen gefundenen Extinktionswerte zu Grunde.

Alle Arbeiten mit dem Reagenz- und Reaktionsgemisch müssen in verdunkeltem Raum ausgeführt werden, da die Reaktion durch Lichteinfall stark begünstigt wird und dann zu ungenauen Messungen führen würde.

Stammlösung		Reagenzgemisch	Extinktions- werte
ccm	Tocopherolmenge in μ pro Ansatz	ccm	
0,1	10	4,9	0,07
0,2	20	4,8	0,14
0,3	30	4,7	0,22
0,4	40	4,6	0,28
0,5	50	4,5	0,35
0,6	60	4,4	0,42
0,7	70	4,3	0,49
0,8	80	4,2	0,56
0,9	90	4,1	0,63
1,0	100	4,0	0,7

E. Kolorimetrische Bestimmung

Die Messung der bei den Organaufarbeitungen gewonnenen Alkohollösungen geschieht in derselben Weise, wie es für die Aufstellung der Eichkurve beschrieben wurde. Genau pipettierte Mengen der Alkohollösung werden mit entsprechenden Mengen des Reagenzgemisches zusammengebracht und 3 Minuten im Dunkeln stehen gelassen. Der entstehende Farbwert wird im Stufenphotometer (blau-grün-Filter S 50 und 1 cm Küvetten) gemessen. Nach Multiplikation, mit welcher der Verdünnungsgrad berücksichtigt wird, kann die enthaltene Tocopherolmenge aus der Eichkurve abgelesen werden.



F. Vorversuche

Die Vorversuche dienten dazu, die Analysenmethode auf Fehlerquellen zu untersuchen und mit Hilfe additiver Werte auf ihre Genauigkeit zu überprüfen.

- 1) Die ersten Versuche galten der Verseifungstechnik und der Ausbeute an Vitamin E aus Organproben und der Wiederauffindung additiver Werte in Abhängigkeit von der Zeit.

Es wurden 6 Proben untersucht, bei denen teilweise Vitamin E in Form einer öligen Lösung von d,l - α -Tocopherolacetat zugesetzt wurde. Als Einwaage wurden je 2 g frische fein zerkleinerte Rattenleber verwendet. Analysen wurden mit folgenden Ansätzen durchgeführt:

- a) 2,0 g Leber + 10 ccm 10 %ige meth. KOH
+ 0,5 ccm 10 %ige wässrige Na-Ascorbinat-
lösung. Verseifung bei 65 ° C am Kugelrück-
flußkühler, 20 min.

Ergebnis: 35 μ

- b) 2,0 g frische Rattenleber,
10 ccm 10 %ige meth. KOH, 0,5 ccm
10 %ige Na-Ascorbinatlösung, Versei-
fung bei 65 ° C am Kugelrückfluß-
kühler, 30 min.

Ergebnis: 38 μ

- c) 2,0 g frische Rattenleber
+ 100 Tocopherolacetat
in öliger Lösung. Versei-
fung wie bei a).

Ergebnis: 95 μ

- d) 2,0 g Leber + 100 Tocophe-
rolacetat in öliger Lösung,
Verseifung wie bei b).

Ergebnis: 125 μ

- e) 2,0 g Leber, zweimal mit 10 ccm
10 %iger Meth. KOH + 0,5 ccm
10 %iger Na-Ascorbinatlösung,
bei 65 ° C am Kugelrückflußküh-
ler je 15 min. verseift.

Ergebnis: 48 μ

f) 2,0 g Leber + 100 μ Tocopherol-
acetat in öliger Lösung, Ver-
seifung wie bei e).

Ergebnis: 140 μ

2) Es wurde untersucht, ob ein höherer Zusatz des Na-Ascorbinats bei der Verseifung die Tocopherolausbeute günstig beeinflusst. Dazu werden je 3 Organproben, denen eine bekannte Tocopherolacetatmenge zugesetzt wurde, bei verschiedenen Na-Ascorbinatzusätzen verseift. Die Organe wurden von einer getöteten männlichen Ratte vom Gewicht 230 g frisch entnommen und mechanisch zerkleinert.

a) 1,5 g Leber + 100 μ Tocopherol-
acetat in öliger Lösung zweimal
mit je 10 ccm 10 %iger KOH und
0,5 ccm 10 %iger Na-Ascorbinat-
lösung bei 65 ° C am Kugelrück-
flußkühler je 15 min. verseift.

Ergebnis: 130 μ

b) 1 g Niere + 100 μ Tocopherol-
acetat in öliger Lösung, Ver-
seifung wie bei a).

Ergebnis: 114 μ

c) 1,5 g Muskulatur + 100 μ Toco-
pherolacetat in öliger Lösung,
Verseifung wie bei a).

Ergebnis: 108 μ

d) 1,5 g Leber + 100 μ Tocopherol-
acetat in öliger Lösung.
Verseifungsdauer wie bei a),
jedoch wurden statt 0,5 ccm
Na-Ascorbinatlösung jeweils
1 ccm verwendet.

Ergebnis: 133 μ

e) 1 g Niere + 100 μ Tocopherol-
acetat, Verseifung wie bei d).

Ergebnis: 110 μ

f) 1,5 g Muskulatur + 100 μ -
Tocopherolacetat, Verseifung
wie bei d).

Ergebnis: 115 μ

3) Feststellung eines evtl. Tocopherolverlustes bei der Chromatographie.

- a) 1 ccm einer 1⁰/oigen Lösung von α -Tocopherol in Äthanol wird mit weiteren 9 ccm Äthanol verdünnt und so der Messung zugeführt.

Ergebnis: 980 μ ,

eingetretener Verlust: 2 %.

- b) 1 ccm derselben Tocopherollösung wird mit 60 ccm Petroläther gemischt und der Chromatographie an Al_2O_3 (3 Stunden bei 400⁰ C geglüht und mit 12 % H_2O desaktiviert) unterworfen. Die Aluminiumoxydsäule wurde vorher mit Petroläther angefeuchtet und die Tocopherollösung nochmals mit 40 ccm Petroläther nachgespült. Das Tocopherol wird mit 60 ccm Benzol eluiert, welches auf dem Wasserbad bis zur Trockne eingedampft wird. Der verbleibende Rückstand wird nun in 10 ccm Äthanol aufgenommen und darin die Vitamin E-Farbreaktion durchgeführt.

Aus dem ermittelten Extinktionswert berechnet sich eine Menge von 960 μ . Das bedeutet einen weiteren Verlust von 2 % bei Durchführung der Chromatographie.

- c) 1 ccm der 1⁰/oigen Lösung wird mit 50 ccm Äther verdünnt und so der Chromatographie zugeführt. Weitere Versuchsanordnung wie bei b).

Bei der Messung finden sich nur 150 μ (= 15 %) der Gesamtmenge.

- 4) Es wurde eine Methode gesucht, bei der eine Reihe bei der Verseifung und dem Verfahren des Ausschüttelns störender Bestandteile schon vor der Verseifung ausgeschieden werden kann.

Die Einwaagen bestanden aus frisch entnommener Rattenleber.

- a) 1,5 g Einwaage werden im Mörser mit geglühtem Seesand ca. 10 min. fein verrieben. Nun werden dreimal je 15 ccm Äther dazugegeben und jedesmal gründlich verrieben. Der Äther wird durch jeweiliges dekantieren zurückgewonnen und auf ca. 1 ccm auf dem Wasserbad eingeeengt. Der Rückstand wird zweimal je 15 min. verseift und bis zur Messung wie üblich behandelt.

Ergebnis: 45 μ

- b) 1,5 g Einwaage + 200 μ -Tocopherol-acetat in öliger Lösung werden im Mörser mit geglühtem Seesand verrieben und weiterbehandelt wie bei a).

Ergebnis: 235 μ

Das Verfahren hat keine Nachteile in Bezug auf die Tocopherol-ausbeute. Dies konnte auch in weiteren Versuchen, in denen Herz-, Nieren-, Milz-, Lungen- und Blutproben für die Untersuchung herangezogen wurden, gezeigt werden.

5) Ergebnisse der Vorversuche

Die Versuche zeigen die Überlegenheit einer Methode, bei der das Material 2 x mit je 0,5 cm³ 10 %iger Na-Ascorbinatlösung und 10 cm³ 10 %iger meth. Kalilauge je 15 min. verseift wird.

G. Endgültige Analysenmethode

- 1) Die Organe oder Teile derselben werden auf der Analysenwaage gewogen.
- 2) Es folgt die grobe mechanische Zerkleinerung mit der Schere und anschließendes Verreiben mit Seesand (ca. 10 min.)
- 3) Das Vitamin E (und alle anderen ätherlöslichen Bestandteile) wird durch dreimalige Zugabe von je 15 ccm Äther unter ständigem Weiterreiben ausgezogen und die ätherische Lösung durch dekantieren abgetrennt und anschließend auf dem Wasserbad bis auf etwa 1 ccm eingengt.
- 4) Dem Rückstand werden 10 ccm 10 %ige meth. KOH und 0,5 ccm 10 %ige Na-Ascorbinatlösung zugesetzt und die Lösung bei 65 ° C am Kugelrückflußkühler verseift.
- 5) Nach 15 min. werden weitere 10 ccm 10 %ige meth. KOH und 0,5 ccm 10 %ige Na-Ascorbinatlösung zugesetzt und nochmals 15 min. bei 65 ° C verseift.

- 6) Die verseifte Lösung wird in einen Schütteltrichter umgefüllt und das Kölbchen zweimal mit je 20 ccm wasserges. Petroläther ausgespült, die gleich zum Extrahieren verwendet werden.
Der wasserlösliche Rückstand wird noch zweimal mit je 40 ccm wassergesättigtem Petroläther ausgeschüttelt.
- 7) Der wasserlösliche Rückstand wird abgelassen, die vereinigten Petrolätherauszüge in den Scheidetrichter überführt und nun
 - 3 x mit ca. 40 ccm Wasser,
 - 1 x mit ca. 40 ccm 5 %iger KOH und noch
 - 3 x mit ca. 40 ccm Wasser ausgeschüttelt.
- 8) Von dem so gereinigten Petrolätherextrakt werden 40 ccm (1/3) in ein Birnenkölbchen gefüllt und auf ca. 2 ccm eingedampft. Eine gelbliche Färbung dieses Extraktes deutet auf Beimischung von Carotinoiden hin, die durch Zusatz von 2 ccm SbCl_3 -Lösung zerstört werden. Es bildet sich ein Carotinkomplex in Form eines blauen Niederschlages, der in Benzol unlöslich ist.
- 9) Der Inhalt des Birnenkölbchens wird nun auf eine ca. 12 cm hohe mit Petroläther angefeuchtete Al_2O_3 Säule entleert und sofort mit ca. 60 ccm wasserfreiem Petroläther nachgewaschen.
- 10) Darauf werden die Unterlagen gewechselt und das Vitamin E mit 60 ccm Benzol eluiert. Das Eluat wird bis zur Trockne eingedampft und in 3 ccm Alkohol aufgenommen.
- 11) Von dieser Lösung werden 0,5 bzw. 1,0 ccm in je ein Reagenzglas pipettiert und auf 5 ccm mit dem Vitamin E-Reagenz nach Emmerie und Engel aufgefüllt.
- 12) Die Messung erfolgt wie bei der Aufstellung der Eichkurve beschrieben wurde.

Nach den Ergebnissen der Vorversuche liegt die Fehlergröße des Verfahrens gemessen an der Auffindung additiver Werte bei maximal $\pm 5\%$, sofern eine Gewebsmenge zur Analyse gebracht wird, die insgesamt zwischen 20 und 200 μg Tocopherol enthält. Sollte nach Aufarbeitung die Tocopherol-

konzentration in der zuletzt erhaltenen benzolischen Lösung einen Gehalt von $0,5 \text{ mg cm}^3$ übersteigen, so ist eine entsprechende Verdünnung vorzunehmen. Im allgemeinen lassen sich pro g Gewebe noch 5μ Tocopherol bestimmen.

Weiterhin wurde durch die Vorversuche bewiesen, daß bei Anwendung des chromatographischen Verfahrens nach Zerstörung eventl. vorhandener Carotinoide und Vitamin A, mit weiteren Störsubstanzen, die die eigentliche Nachweisreaktion der Tocopherole mit Fe Cl_3 und α - α' -Dipyridyl beeinflussen könnten, nicht zu rechnen ist. Durch die Chromatographie werden nämlich die Tocopherole von anderen reduzierenden Körpern wie z.B. Antioxydantien BHT und BHA, die ebenfalls eine positive Fe Cl_3 - α - α' -Dipyridylreaktion geben, getrennt. Damit dürfte nach dem gegenwärtigen Stand der Untersuchungen, die Spezifität des Verfahrens für die Bestimmung der Tocopherole gesichert sein.

H. Die Auswahl der Tiere

Bei allen Versuchen wurden männliche Ratten der Sprague-Dawley-Zucht mit Körpergewichten von 150 g mit Schwankungen von $\pm 30 \text{ g}$ verwendet.

I. Verwendete Vitamin E-Präparate

Durch eigene Untersuchungen sollte dargetan werden, inwieweit anderweitige Applikationsformen des Vitamins E als die bisher übliche der intramuskulären Injektion öligere Lösungen Vorteile hinsichtlich einer schnelleren Vitamin E-Verteilung im Organismus und somit des erwünschten therapeutischen Effektes bieten können.

Um die intravenöse Injektion des Vitamins E zu ermöglichen, wurde eine mit Hilfe geeigneter Lösungsvermittler hergestellte klare, wasserlösliche Form des von Natur aus fettlöslichen d, 1 - α -Tocopherols, bzw. des d, 1 - α -Tocopherolacetats verwendet. ++ Die intravenöse Verabreichung öligere Vitamin E-Präparate wurde von den Tieren nicht vertragen, selbst wenn sich die Injektion über mehr als 120 sec. erstreckte.

++) Der Firma Knoll sei für die Herstellung und Überlassung der im Text mit ++ versehenen klar wasserlöslichen bzw. öligen sterilen Vitamin E-Präparate und Lösungsvermittler bestens gedankt.

Im einzelnen kamen folgende Wirkstofflösungen zur Anwendung:

- 1) Eine Lösung von d, 1 - α -Tocopherol in physiologischer Kochsalzlösung unter Anwendung des Lösungsvermittlers "1c" (++)

1 ccm³ enthält 6 mg d, 1 - α -Tocopherol.

- 2) "Enoulan forte" (++) verdünnt mit "1 c" (++)

1 ccm enthält 6 mg d, 1 - α -Tocopherol.

- 3) Eine Verdünnung eines wasserlöslichen Vitamin E-Präparates "1 d" (++) mit physiologischer Kochsalzlösung.

1 ccm enthält 6 mg d, 1 - α -Tocopherolacetat.

- 4) Eine Lösung von d, 1 - α -Tocopherol in Olivenöl.

1 ccm enthält 6 mg d, 1 - α -Tocopherol.

K. Entnahme der Organe

Die einzelnen Organe bzw. Teile derselben wurden nach Dekapitation der Tiere nach folgendem Schema entnommen:

Blut: Das bei der Dekapitation austretende Blut wurde in einer Glasschale aufgefangen und in seiner gesamten Menge aufgearbeitet.

Harnblase: Soweit die Blase mit Harn gefüllt war, wurde diese unentleert entnommen und der Aufarbeitung unterworfen.

Darm: Es wurde jeweils ein bestimmter Abschnitt des Jejunums, des Colons und des Rectums entnommen und insgesamt aufgearbeitet.

Gehirn: Nach Abheben der Schädelknochen wurde das Gehirn nebst Kleinhirn in seiner Gesamtheit entnommen.

Haut: Unmittelbar kaudal des Processus xiphoideus wurde ein 2 cm großes Stück rasierte Bauchhaut entnommen.

- Hoden: Nach Abtrennung des gesamten Nebenhodens nebst Samenleiter und Gefäßen wurde der Hoden mit Fascie aufgearbeitet.
- Knochen: Es wurde der Femur der linken Hinterextremität entnommen.
- Leber: Es wurden 1 - 2 g des vom Bindegewebe und von Gefäßen befreiten Gewebshomogenats aufgearbeitet.
- Lunge: Das gesamte, von Hauptbronchien befreite Gewebshomogenat wurde verwendet.
- Milz: Gesamtorgan.
- Muskel: 1 - 2 g des homogenisierten Quadriceps gelangten zur Analyse.
- Herz: Gesamtorgan.
- Nieren: Beide Gesamtorgane.
- Nebennieren: Beide Gesamtorgane wurden nach bestmöglicher Entfernung des einhüllenden Bindegewebes aufgearbeitet.

IV. VERSUCHSERGEBNISSE UND DISKUSSION

- 1) 6 männliche Ratten der Sprague-Dawley-Zucht mit dem Gewicht von 130 - 150 g erhielten 3 mg dl - α -Tocopherol in Olivenöl (= 0,5 ccm) intravenös gespritzt.

Die Tiere wurden in einen Ätherrausch versetzt und dann die Vena jugularis durch einen Hautschnitt von ca. 1,5 cm freigelegt und von Binde- und Fettgewebe stumpf freipräpariert.

Die Tiere starben ausnahmslos während der Injektion an Embolie, selbst wenn die Injektion sich über mehr als 120 sec. erstreckte.

- 2) 6 männliche Ratten vom gleichen Gewicht und aus der gleichen Zucht wie bei Versuch 1) erhielten 3 mg dl - α -Tocopherol ("Enoulan forte" verdünnt mit "1c") intramuskulär verabreicht, und zwar in den Quadriceps des linken Hinterschensels. Die Anreicherung in den Geweben war danach so gering, daß der Versuch abgebrochen wurde.
- 3) In einer neuen Versuchsreihe wurden 11 männliche Tiere angesetzt. Sie erhielten 3 mg dl - α -Tocopherol intravenös im Ätherrausch, wie bei Versuch 1) beschrieben. Das Tocopherol wurde in Form einer Lösung in "1c" verdünnt mit phys. Na Cl-Lösung als Emulsion verabreicht. Das Präparat wurde von allen Tieren ohne Komplikationen vertragen.

Die Tiere wurden in Abständen von der Zeit zwischen 10 Minuten und 20 Tagen durch Dekapitation getötet, die Organe wie oben beschrieben gewonnen und aufgearbeitet. Die Ergebnisse sind in Tabelle I zusammengefaßt.

- 4) 11 Tiere wie bei Versuch 3) erhielten 6 mg dl - α -Tocopherol intramuskulär (in den Quadriceps der linken Hinterextremität) appliziert.

Präparat wie bei Versuch 2).

Die Tiere wurden in Abständen von der Zeit wie bei Versuch 3) getötet und aufgearbeitet. Die Ergebnisse sind in Tabelle I den Ergebnissen des Versuchs 3) gegenübergestellt.

- 5) 6 Tiere erhielten 3 mg Tocopherolacetat intravenös im Ätherrausch verabreicht. Das Tocopherolacetat wurde in Form des Präparates "Id" verdünnt mit phys. Na Cl-Lösung als Emulsion angewendet.

Die Tiere wurden in Abständen von der Zeit zwischen 30 Minuten und 10 Tagen nach der Injektion getötet. Zur Verarbeitung gelangten das Blut, die Leber, der Darm und die Muskulatur.

Siehe Tabelle II.

- 6) Die Tiere erhielten 6 mg des Präparates wie bei Versuch 5) intramuskulär (Quadriceps des linken Hinterschenkels) und wurden in Abständen von der Zeit zwischen 24 Stunden und 10 Tagen getötet.

Zur Aufarbeitung gelangten Blut, Leber, der Quadriceps des rechten Hinterschenkels und, um das Depot der Injektion zu erfassen, der Quadriceps des linken Hinterschenkels.

Siehe Tabelle III.

- 7) 6 Tiere erhielten 6 mg Tocopherol gelöst in Olivenöl intramuskulär (Quadriceps des linken Hinterschenkels) appliziert. Sie wurden in Abständen von der Zeit zwischen 24 Stunden und 20 Tagen getötet. Zur Untersuchung wurden von den Organen das Blut, die Leber, der Quadriceps des linken und rechten Hinterschenkels und der Darm herangezogen.

Siehe Tabelle IV.

TABLE I

Gesamttocopherol-Gehalte in 8 pro Gesamtorgan nach der Injektion
von 3 mg d, 1 - α -Tocopherol in wässriger Emulsion in Zeitabständen von

[illegible]

TABELLE II

Gesamttocopherol-Gehalte in μ pro Gesamtorgan nach der intravenösen Injektion von 3 mg Tocopherolacetat in wässriger Emulsion

Tier Nr.:	1	2	3	4	5	6
Zeit:	30 Min.	1 Std.	1 Tag	3 Tage	7 Tage	10 Tage
Blut	52	48	36	24	20	10
Leber	180	220	260	270	165	40
Darm	460	480	380	230	225	120
Muskulatur	600	570	800	600	400	300

TABELLE III

Gesamttocopherol-Gehalte in μ pro Gesamtorgan nach der intramuskulären Injektion von 6 mg Tocopherolacetat in wässriger Emulsion

Tier Nr.:	1	2	3	4	5
Zeit:	24 Std.	3 Tage	4 Tage	7 Tage	10 Tage
Blut	Spuren	5 - 10	30	30	40
Leber	160	130	260	160	130
Muskulatur	240	360	400	310	300
Injektions- depot	3600	1500	1100	420	400

TABELLE IV

Gesamt-tocopherol-Gehalte in μ pro Gesamtorgan nach der intramuskulären Injektion von 6 mg d, 1 - α -Tocopherol in öliger Lösung

Tier Nr. :	1	2	3	4	5	6
Zeit:	24 Std.	3 Tage	4 Tage	7 Tage	15 Tage	20 Tage
Blut	Spuren	Spuren	Spuren	Spuren	Spuren	20
Leber	300	100	60	40	35	150
Darm	Spuren	20	200	300	200	100
Muskulatur	160	300	550	450	480	500
Injektions- depot	4400	4500	3300	3000	3300	3000

In der Tabelle I sind die Gesamt-tocopherol-Organ-gehalte nach intravenöser bzw. intramuskulärer Applikation einer wässrigen Lösung von d, 1 - α -Tocopherol niedergelegt. Die Bestimmung des Vitamin E-Gehaltes pro Gesamtorgan war für die kleineren, anatomisch klar abgegrenzten Organe gut durchführbar, jedoch schwieriger für größere Gewebssysteme, wie Muskel und Darm. Bei diesen wurde zunächst der Vitamin E-Gehalt pro g Gewebe bestimmt, um dann nach entsprechender Multiplikation den Vitamin E-Wert pro Gesamtorgan zu errechnen.

Die Aufstellung zeigt eindeutig die Überlegenheit einer intravenösen Vitamin E-Applikation im Hinblick auf die gewünschte allgemeine Gewebsspeicherung. Mit Ausnahme einiger Gehalte von Darm und Muskel steigen die Vitamin E-Konzentrationen nach intravenöser Injektion um das Doppelte bis 20-fache der Werte an, die nach intramuskulärer Injektion zu finden sind, wobei berücksichtigt werden muß, daß intramuskulär die doppelte Wirkstoffmenge verabreicht wurde. Innerhalb von 8 bis 10 Tagen fallen die nach intravenöser Injektion erhaltenen Werte wieder ab, um sich den Werten anzugleichen, die nach einer intramuskulären Applikation beobach-

tet werden. Darm und Muskel zeigen in ihrem Verhalten gewisse Abweichungen. Zwar liegen 3 Tage nach der Behandlung die Gehalte bei intravenöser Injektion noch höher als die nach intramuskulärer, jedoch steigen vom 3. bis 10. Tage die Vitamin E-Konzentrationen der intramuskulär behandelten Tiere erneut an, bis zu Werten, die zwar jetzt über denen der intravenös gespritzten Tiere liegen, jedoch deren Höchstwerte am 1. Tag kaum überschreiten. Nach 20 Tagen sinken auch hier die Vitamin E-Konzentrationen auf das Niveau der intravenös behandelten Tiere ab.

Etwas anders verhält sich das Blut, das schon nach 24 Stunden die Ausgangswerte der Vitamin E-Gehalte zeigt.

In den Tabellen II und III sind die Gesamttocopherol-Organ Gehalte nach intravenöser bzw. intramuskulärer Applikation einer wässrigen Lösung von d, 1- α -Tocopherolacetat zusammengestellt. Die Werte liegen im Durchschnitt etwas höher als nach der Applikation von d, 1- α -Tocopherol, aber auch hier zeigt sich deutlich die Überlegenheit der intravenösen Applikationsform. Die Erfassung des Injektionsdepots läßt erkennen, daß nach 24 Stunden noch 60 % der verabfolgten Wirkstoffmenge an der Injektionsstelle nachgewiesen werden kann. In den nächsten 10 Tagen sinkt die Menge auf etwa 10 % ab.

Die in Tabelle IV aufgestellten Werte veranschaulichen besonders eindrucksvoll die Depotwirkung einer rein öligen Lösung des Vitamins E. Noch nach 20 Tagen können 50 % der verabreichten Tocopherolmenge in unmittelbarer Umgebung der Injektionsstelle nachgewiesen werden. Die Werte, die dabei für den Gehalt der Leber und die gesamte Skelettmuskulatur ermittelt werden, erreichen trotzdem die Höhe der Werte, die in den vorangegangenen Versuchen gefunden wurden.

Mit vorliegenden Untersuchungen sollte die eingangs gestellte Frage geklärt werden, ob im Hinblick auf eine gewünschte Vitamin E-"Stoßtherapie" Applikationsformen für Vitamin E ermittelt werden können, die im Vergleich zur bisher gebräuchlichen intramuskulären Injektion eines öligen Präparates zu höheren Gewebsspeicherungen dieses Wirkstoffes führen.

Eindeutig konnte nachgewiesen werden, daß eine intravenöse Injektion eines mit einem entsprechenden Lösungsvermittler in Wasser emulgierten Vitamin E-Präparates in den verschiedensten Organen zu 2- bis 20-fach höheren Vitamin E-Gehalten gegenüber denen durch intramuskuläre Appli-

kation eines öligen Präparates erreichen führt. Dieser Effekt ist auch dann zu beobachten, wenn statt des dl - α - Tocopherols seine veresterte Form, nämlich dl - α - Tocopherolacetat, verwendet wird.

Die intramuskuläre Injektion eines in Wasser emulgierten Vitamin E-Präparates ist der intravenösen bezüglich der Speicherung des Wirkstoffes insofern unterlegen, da hierbei nur etwa die Hälfte an Vitamin E von einzelnen Organen aufgenommen wird.

Die vorliegenden Versuchsergebnisse scheinen zu dem Hinweis zu berechtigen, daß bei all den klinischen Fällen, bei denen eine Vitamin E-"Stoßtherapie" angezeigt ist, die intravenöse Applikationsform emulgierter wässriger Vitamin E-Präparate durchaus der Injektion öliger Lösungen vorzuziehen ist. Die hierbei erzielten hohen Wirkstoffgehalte sollten Voraussetzung dafür sein, daß der von Markees (94) bereits postulierte pharmakodynamische Effekt des Vitamins E sich voll entfalten kann.

Die intramuskuläre Applikation öliger Tocopherollösungen wird dann angebracht sein, wenn bei einem klinischen Fall ein echter Vitamin E-Mangel vorliegt. Hierbei kann durch das gesetzte Depot, in dem 20 Tage nach Verabreichung noch 50 % der verabfolgten Menge nachzuweisen sind, dem Organismus laufend Wirkstoff über einen längeren Zeitraum zugeführt und so ein Vitamin E-Defizit behoben werden.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Auf Grund früherer Versuchsergebnisse kann die Vermutung ausgesprochen werden, daß die therapeutischen Erfolge mit Vitamin E-Präparaten weniger durch die Auffüllung eines an diesem Wirkstoff verarmten Organismus, als vielmehr durch eine allgemeine pharmakodynamische Wirkung des Vitamins E zustande kommen.

Die Intensität einer pharmakodynamischen Wirkung sollte durch die im Organismus zu erreichende Wirkstoffkonzentration bestimmt werden.

Mit den vorliegenden Untersuchungen wurde versucht, die Applikationsform für Vitamin E zu ermitteln, die zu höchsten Gewebsspiegeln führt.

An Vitamin E-Präparaten wurden dl - α -Tocopherol und dl - α -Tocopherolacetat sowohl in öligem als auch mittels Lösungsvermittler in Wasser emulgierter Form an Ratten in Mengen von 3 bzw. 6 mg appliziert.

Die Versuchstiere wurden in verschiedenen Zeitintervallen von 10 Minuten bis zu 20 Tagen nach der Vitamin E-Applikation getötet und in 14 Organen mittels chemisch-analytischer Verfahren die Gesamttocopherolgehalte ermittelt.

Die Versuchsergebnisse lassen erkennen, daß höchste Gesamttocopherolgehalte in verschiedenen Organen durch intravenöse Applikation eines mittels Lösungsvermittler in Wasser emulgierten Vitamin E-Präparates beobachtet werden können, wobei es gleichgültig ist, ob das Vitamin E in Form des dl - α -Tocopherols oder als dl - α -Tocopherolacetat verwendet wird.

Nach Diskussion der Versuchsergebnisse wird die Auffassung ausgesprochen, daß eine intravenöse Applikation emulgierter wässriger Vitamin E-Präparate dann angezeigt ist, wenn ein therapeutischer Effekt auf Grund der pharmakodynamischen Wirkung des Vitamins E erwartet wird.

VI. LITERATUR

1. Evans, H.M., Bishop, S.: Science 56 650 (1922)
2. Markees, S.: Int. Vitamin E Kongreß
Venedig Italien, 1955
3. Brüggemann, J., Vit. Horm. 7 10 (1956)
Niesar, K.H.:
4. Matill, H.A., J. Biol. Chem. 44 137 (1920)
Conklin, R.E.:
5. Evans, H.M., Bishop, S.: Am. J. Physiol. 63 396 (1923)
6. Sure, B.: J. Biol.Chem. 58 693 (1924)
7. Evans, H.M., Emerson, O.H.,
Emerson, G.A.: J. Biol. Chem. 113 319 (1936)
8. Karrer, P.: Helvet. chim. acta 21 520 (1938)
9. Todd, A.R., Bergel, F., Nature 142 36 (1938)
Jakob, A., Work, T.S.:
10. Fernholz, E.: Am. Soc. 60 700 (1938)
11. Baxter, J.G., Robeson, C.D.,
Taylor, J.D., Lehmann, R.W.: J. Am. Chem. Soc. 65 918 (1943)
12. Vogel, H., Knobloch, H.: Chemie u. Technik der Vit.
Ferd. Enke Stuttgart 1950
3. Auflage I. Band 247
13. Isler, O.: Helv. chim. acta 21 17 56 (1938)
14. Olcott, H.S.: J. Nutrit. 15 221 (1938)

15. Calkins, V.P., Matill, H.A.: J. Am. Chem. Soc. 66 239 (1944)
16. Emerson, O.H.: J. Biol. Chem. 122 99 (1937)
17. Stern, M.H., Robeson, C.D., J. Am. Chem. Soc. 69 869 (1947)
Weisler, L., Baxter, J.G.:
18. Green, J., Marcinkiewicz, S., Food Agric. 6 274 (1955)
Watt, P.R.:
19. Egitt, P.W.R., Ward, L.D.: J. Sci. Food Agr. 4 569 (1953)
20. Green, J., Marcinkiewicz, S.: Nature 177 86 (1956)
21. Weisler, L., Baxter, J.G., J. Am. Chem. Soc. 67 1230 (1945)
Ludwig, R.I.:
22. Hove E.L., Harris, P.L.: J. Nutrit. 33 95 (1947)
23. Bicknell, R.: Internat. Zschr. Vitaminf. 20 313 (1949)
24. Mason, K.E.: Jale J. Biol. Med. 14 605 (1942)
25. Ames, S.R.: Poultry Science 35 145 (1956)
26. Karrer, P., König, H., Helv. chim. acta 22 1139 (1939)
Ringier, B.H., Salomon, H.:
27. Beckmann, R.: Zschr. Vit. Horm. Fermentf. 1
195 (1955)
28. Lundberg, W.P., Barnes, A.H., J. Biol. Chem. 168 379 (1947)
Claasen, M., Larzon, N.,
Burr, G.O.:
29. Karrer, P., Keller, H.: Helv. chim. acta 21 939, 1161 (1938)
22 253, 617 (1939)
30. Kofler, M.: Helv. chim. acta 25 1469 (1942)

31. Emmerie, A., Engel, C. : Recueil Trav. chim. Fay-Bas
57 1351 (1938)
58 283 (1939)
32. Furter, M., Meyer, R. E. : Helv. chim. acta 22 240 (1939)
33. Bacharach, A. L., Biochem. J. 31 2287 (1937)
Alchorne, E., Glynn, H. E. :
34. Evans, H. M., Burr, G. O. : Mem. Univ. Calif. 8 1-24 (1927)
35. Karrer, P., Demole, V. : Schweiz. med. Wschr. 68 954 (1938)
36. Hume, E. M. : Nature 148 472 (1941)
37. Harris, P. L., Jensen, J. L. : J. Biol. Chem. 156 491 (1944)
38. Abderhalden, B. : Z. Vitamin 16 309 (1945)
39. Beckmann, R. : Zschr. Vit. Horm. Fermentf. 7 (1955)
40. Vogel, H., Knobloch, H. : Chemie u. Technik d. Vitamine
Ferd. Enke Stuttgart 1950
3. Auflage I. Band 236
41. Binnington, D. S., Cereal Chem. 18 678-86 (1941)
Andrews, J. S. :
42. Stepp, W., Kühnau, S., Die Vitamine und ihre klin. Anwendung
Schroeder, J. H. : S. 726. Ferd. Enke Stuttgart 1957, 7. Aufl.
43. Brown, F. : J. Soc. Food Agr. 4 161-5 (1953)
44. Quaife, M. L. : J. Biol. Chem. 175 605 (1948)
45. Beckmann, R. : Zschr. Vit. Horm. Fermentf. 1 175 (1955)
46. Brüggemann, J., Niesar, K. H. : DTW 61 375 (1954)

47. Kaag, F.C., van der; Ann.N.Y.Acad.Sci. 52 276 (1949)
Teunissen, G.H.B.,
Emmerie, A., Eckelen, M.:
48. Kofler, M.: Helv.chim.acta 26 2166 (1943)
49. Kieferle, F., Seuss, A., Milchwissenschaft 8 57-62 (1953)
Schraudy, E.:
50. Gebauer, H.: Was fehlt? Vitamine. Akad.Verlagsges.
Leipzig (1956)
51. Brazler, J.W., Loosli, J.K., J.Nutrit. 42 59 (1950)
Krukowski, V.N.,
Maynard, L.A.:
52. Brown, F.: Nature 171 790 (1953)
53. Antoniani, C., Ann.Sper.Agrar.Rome 2 481-8 (1948)
Fedorico, L.,
Missiroli, M.:
54. Mason, K.E.: J.Nutrit. 23 71 (1942)
55. Hill, H., Decker, P.: Dtsch. Tierärztl. 64 17 (1957)
56. Criddle, F.E., Morgan, A.F.: Proc.Soc. Exptl. Biol. Med. 78 41-6 (1951)
57. Lundberg, W.O., Barnes, R.H., J. Biol. Chem. 153 265-74 (1944)
Clausen, M., Burr, G.O.:
58. Watts, B.M., Cunha, T.J., Oil and Soap 23 254 (1946)
Major, R.:
59. Jürgens, R., Lang, K. "Die Ernährung", Springer-Verlag
und Schön, P.W.: Berlin, 474 (1952)
60. Brinkhous, K.M., Am.J.Pathol. 17 81 (1941)
Warner, B.D.:

61. Engel, C. : Am.N.Y.Acad.Sci. 52 292 (1949)
62. Engel, S., Heins, J.T. : Acta Brevia Neerl.Physiol.Pharmacol.
Microbiol. 13 37 (1943)
63. Klatskin, G., J.Clin.Invest. 31 159 (1952)
Molander, D.W. :
64. Cuthbertson, W.F.J., Biochem.J. 34 34 (1940)
Ridgeway, R.R.,
Drummond, J.C. :
65. Dju, M.Y., Quaife, M.L., Am.J.Physiol. 160 (1930)
Harris, P.L. :
66. Simon, E.J., zit. Hill, H. : DTW 64 12-14 (1957)
Milhorat, A.T. :
67. Simon, E.J. u.Mitarb. : J.Lab.Clin.Med. 39 802 (1956)
68. Markees, S. : Schweiz.med.Wschr. 85 1234-338 (1955)
69. Stepp, W., Kühnau, J., Die Vitamine und ihre klin. Anwendung.
Schroeder, J.H. : Ferd.Enke Stuttgart 7.Aufl. S. 116 (1957)
70. Berthe, N. : Tunisie Med. 43 785 (1955)
71. Dam, H. : Fette, Seifen, Anstrm. 54 633-35 (1952)
72. Philips, H.J., Food Technol. 6 74 (1952)
Williams, J.L. :
73. Ruppel, W. : Arch.Exper.Path.Pharm. 206 584 (1949)
74. György, P. : Hopkins Press, Baltimore (1953)
75. Vogel, H., Chemie und Technik d.Vitamine
Knobloch, H. : Ferd.Enke Stuttgart 3.Aufl. S. 276 (1950)

76. Moore, T.: Biochem.J. 34 1321 (1940)
77. Bacharach, A.L.: Quart. J. Pharmacol. 13 138 (1940)
78. Michaelis, L.,
Wollmann, S.H.: Science 109 313 (1949)
79. Dam, H., Kruse, I.,
Prange, I., Sondergaard, E.: Acta Physiol.scand. 22 299 (1951)
80. Markees, S.: Helv.med.Acta 21 516 (1954)
81. Dam, H., Granados, H.: Acta pharmacol. 8 47 (1952)
82. Dam, H., Prange, I.,
Sondergaard, E.: Acta pharmacol. 8 23 (1952)
83. Moore, T., Sharman, I.M., J.Biochem. 58 7 (1954)
Ward, R.:
84. Müller, R.: Vit. u. Horm. 6 303 (1954)
85. Martin, A.J.,
Marc, T.: Proc.Biol.Soc. 13 3 (1936)
86. Markees, S.: Exp.Suppl. 1 208 (1953)
87. v.Massenbach, W.,
Heinsen, H.A.: Zbl.Gynäkol. 66 540 (1948)
88. v. Massenbach, W.,
Stadtmüller, A.: Zbl.Gynäkol. 74 25 (1952)
89. Verzár: Int.Vitamin E Kongreß Venedig
Italien, 1955
90. Stepp, W., Kühnau, J.,
Schroeder, J.H.: Die Vitamine und ihre klin. Anwendung
Ferd.Enke Stuttgart 7.Aufl. S.743 (1957)

91. Kämmerer, K.: Vet.med.Nachr. 229 (1956)
92. Stähler, F., Rabe, G., Arch.Gynäkol. 172 236 (1942)
Hopp, W.:
93. Stähler, F., Rabe, G., Arch.Gynäkol. 174 236 (1942)
Hopp, W.:
94. Markees, S.: Int.Z.Vitaminf. 22 335-56 (1956)
95. Mason, K.E.: The Vitamins 3 514 (1954)
96. Zagami, V., Sindoni, M.: Rev.di Pathol.experim. 12 (1934)
97. Mason, K.E.: J-Biol.med. 14 605 (1942)
98. Goettsch, M.: J.Nutrition 23 513 (1942)
99. Mason, K.E., zit. Mason: The Vitamins 3 520 (1954)
100. Blandan, R.J., Kaunitz, H., J.Nutrit. 38 97 (1949)
Slanetz, C.A.:
101. Menschik, Z.: Quart.J.Exptl.Physiol. 34 97 (1948)
102. Lopes de Faria: Ann.N.Y.Acad.Sci. 52 121 (1949)
103. Lopes de Faria: J.Amer.Med.Ass. 131 626 (1946)
104. Demole, V., Pfaltz, H.: Schweiz.med.Wschr. 69 123 (1939)
105. Cheng, P.W., Proc.Jowa Acad. Sci. 60 290 (1953)
Thomas, B.H.:
106. Woollam, D.H.M., B M J 2 1262 (1956)
Miller, I.W.:
107. Card, L.E., Mitchell, H., Poultry Sci. 9 (1930)
Hamilton, T.T.S.:

108. Adamstone, F.B. : J.Morph. 52 47 (1931)
109. Evans, H.M., Burr, G.O. : J.Biol.Chem. 76 273-6 (1928)
110. Verzář, F., Kokas, E. : Pflügers Arch.Physiol. 227 511 (1931)
111. Curto, G.M. : Acta Vitaminologica 8 7 (1954)
112. Ingelmann, Sundberg, A. : Acta Endocrinol. 17 165 (1954)
113. Mason, K.E., Maurer, S.J., Proc.Third Internat. Congres on
Rumery, R.E. : VE Venedig, Italien, Sept. 1955
114. Adamstone, F.B. : Arch. of Pathol. 43 301 (1947)
115. Gullickson, T.W., J. Dairy Sci. 31 557 (1948)
Palmer, L.S., Boyd, W.L.,
Nelson, J.W., Olson, F.C.,
Calvery, C.E., Bayer, P.D. :
116. Underbjerg, C.K.L. : J.Sci.15 107-10 (1940)
117. Morelle, J. : C.R.Soc.Biol. 108 804 (1931)
118. Olcott, H.S., Mattill, H.A. : J.Biol.Chem. 104 423 (1934)
119. Anderson, H.D. : zit. Annot. Bibl.Vit. E 1466 (1940-1950)
120. Hummel, J.P. : J.Biol.Chem. 172 421 (1948)
121. Morgulis, S., J.Nutrit. 11 471 - 93 (1936)
Spencer, H.C. :
122. Goetsch, M., J.exp.Med. 54 145 (1931)
Pappenheimer, A.M. :
123. Olcott, H.S. : J.Nutrit. 15 221 (1938)
124. Telford, I.R., Proc.Soc.Exptl.Biol.Med.41 291-315
Emerson, G.A., Evans, H.M. : (1939)

125. Tonutti, E. : Zschr. f. Vitaminf. 13 1 (1943)
126. Pappenheimer, A.M. : Am.J.Pathol. 15 179 (1939)
127. Hove, E.L. : Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 63/3 508 (1946)
128. Rogers, W.M.,
Pappenheimer, A.M. : J.exp.Med. 54 167 (1931)
129. Aloisi, M.,
Meldolisi, G. : Lo Sperimentale 94 742 (1940)
130. Hepding, L. : Berlin.u.Münchener Tierärztl.Wschr.
88 - 91 (1947)
131. Dam, H.,
Glavind, J. : Scand. Arch. Physiol. 82 299 (1939)
132. Gerriets, E. : Arch. Geflügelzucht u. Kleintiere 3
54 (1954)
133. Anderson, H.D., Elvehjem, C.A., Gonze, J.I. : Proc.Soc.exp.Biol.Med. 42 750 (1939)
134. Mason, K.E., Telford, I.E. : Arch.of Path. 43 363 (1947)
135. Whiting, F., Willmann, J.P., Loosli, J.K. : J. Animal Sci. 8 234-42 (1949)
136. Blaxter, K.L., Watts, P.S., Wood, W.A. : Brit.J.Nutrit. 5 (1951)
137. Blaxter, K.L. : Proc.Third Internat. Congres on VE
Venedig, Italy, Sept. 1955
138. Pappenheimer, A.M. : Physiol. Rev. 23 37 (1943)
139. Blaxter, K.L. : Vet. Rev. Annot. 1 91-114 (1955)
140. Klussendorf, R.C. : North.Am.Vet. 36 909 (1955)

141. Culik, R., Bacigalupo, F.A., Animal Sci. 10 1006 (1951)
Thorp, F., Luebke, R.W.,
Nelson, R.H.:
142. Trevino, G.S.: Southwestern Vet. 4 17 (1951)
143. Blaxter, K.L., Brown, F.: Nutrit. Abstr. Rev. 32 1 (1952)
144. Mason, K.E., Emmel, A.F.: Anat. Record 92 33 (1945)
145. Madsen, L.L., Mc.Cay, C.M., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 30
Maynard, L.A.: 1434 (1933)
146. Gatz, A.J., Houchin, O.B.: Anat. Record 110 249 (1951)
147. Blaxter, K.L., Watts, F.S., Brit. J. Nutrit. 6 125, 144 (1952)
Wood, W.A.:
148. Gullickson, T.W., Science 104 312 (1946)
Calverley, C.E.:
149. Gullickson, T.W.: Ann. N. Y. Acad. Sci. 52 256 (1949)
150. Willmann, J.P., Loosli, J.K., J. Animal Sci. 4 128 (1945)
Asdell, S.A., Morrison, F.B.,
Olafson, P.:
151. Nieberle, K., Cohrs, P.: Lehrbuch der spez. pathol. Anatomie
der Haustiere. G. Fischer Verlag Jena
(1954)
152. Jürgens, R.; Lang, K. und "Die Ernährung". Springer-Verlag
Schön, P.W.: Berlin, 473 (1952)
153. György, P., J. Exp. Med. 70 185 (1939)
Goldblatt, H.:
154. Goldschmidt, S., Vars, H.M., J. Clin. Med. 75 355 (1942)
Ravdin, I.J.:

155. György, P., J.Exp.Med. 75 355 (1942)
Goldblatt, H.:
156. Schwarz, K.: Z.Physiol.Chem. 281 101, 109, (1944)
157. Hinsworth, H.P., Nature 163 30 (1949)
Lincoln, O., Lindan, O.:
158. Lindan, O.: Brit.J.Exptl. Pathol. 32 471 (1951)
159. György, P., Goldblatt, H.: J.Exper.med. 89 245 (1949)
160. Earle, D.P., Victor, J.: J.Exper.Med. 73 161 (1941)
161. Hove, E.L., Copeland, J.Nutrit. 39 397 (1949)
D.H., Salomon, W.D.:
162. Schwarz, K.: Proc.Soc.Exptl.Biol. Med.
77 818 (1951)
78 852 (1951)
163. Matet, A., Matet, J., Soc.Biol. 143 235 (1949)
Fridensen, O.:
164. Schwarz, K.: Merck Report 63 3 (1954)
165. Fite, G.L.: Ann. N. Y. Acad. Sci. 57 831 (1954)
166. Bolle, W.: Arch. wiss. prakt. Tierheilk. 57 264 (1928)
167. Nussbag, W.: Arch. wiss. prakt. Tierheilk. 61 1 (1930)
168. Obel, A.: Einar Munksgaard Copenhagen (1953)
169. Bomskow, C., Klin.Wschr. 19 334 (1941)
v.Kaula, K.N.:
170. Horn, Z., Brogsch, S., Zschr. ges. inn.Med. 10 1940 (1955)
Altmann, O.:

171. Krone, H. A. : Int. Zschr. Vitaminf. 24 12 (1952)
172. Lillie, R. D., Ashburn, L. L., Public Health Pept. 57 502 (1942)
Sebrell, W. H., Daft, F. S.,
Lowry, J. :
173. Wachstein, M. : Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 59 73
(1945)
174. Victor, J., J. exptl. Med. 82 375 (1945)
Pappenheimer, A. M. :
175. Hartmann, F., Hertel, R., Arch. exper. Path. Pharmac. 214
Schulze, G., Wellmar, H. : 152 (1952)
176. Teunissen, C., Emmerie, A., Int. Zschr. Vitaminf. 21 140 (1949)
van Eckelen, M. :
177. Brüggemann, J., D. T. W. 61 1 (1954)
Niesar, K. H. :
178. Funfak, H. : Ärztl. Forsch. 6 247 (1952)
179. Shute, E. : The Summary 7 76 - 96 (1955)
180. Mahal, H. : T U 8 56 (1953)
181. Iseli, R. : T U 6 187 (1957)
182. Bonfert, A., Arp, J. : T U 23/24 455 (1953)
183. Spicer, A. : Vet. J. 96 351 (1940)
184. Gysler, M. : Schweiz. Arch. Tierheilk. 86 336
(1944)
185. Peters, T., Der prakt. Tierarzt 3 80 (1950)
Neumann, H. J. :

186. Labatut, M. : Rev. Path, Comp. 48 646 (1948)
187. Carpenter, L.E., Ann. N. Y. Acad. Sci. 52 269 (1949)
Lundberg, W.O. :
188. Vogt-Möller, P., Münch. tierärztl. Wschr. 82 637 (1931)
Bay, F. :
189. Schlaak, W. : T.U. 8 302 (1956)
190. Tobler, H. : T.U. 15/16 286 (1953)
191. March, H. : J. Am. Vet. Med. Assoc. 108 256 (1946)
192. Vawter, L.R. : Mich. State Coll. Vet. 11 104 (1951)

Es ist mir eine angenehme Pflicht, dem Vorstand
des Institutes für Physiologie und Ernährung der
Tiere der Tierärztlichen Fakultät der Universität
München, Herrn Professor Dr. Dr. Jos. Brüggemann,
für die Anregung des Themas zu danken.

Freundlichen Dank schulde ich auch
Herrn Dr. Karl-Heinz Niesar aus dem gleichen
Institut für seine stete Hilfsbereitschaft.

LEBENS LAUF

Am 21. April 1934 wurde ich als Sohn des Rechtsanwalts und Notars Dr. Martin Floegel und seiner Ehefrau Käthe, geb. Lorek, in Breslau/Schlesien geboren.

Von 1940 bis 1944 besuchte ich die Volksschule in Breslau und anschließend die Maria-Magdalenen-Oberschule daselbst. Nach unserer Flucht im Februar 1945 wurde ich im Herbst 1946 in die Oberrealschule Landshut eingeschult, wo ich im Juli 1953 die Reifeprüfung bestand.

Vom Wintersemester 1953/54 ab studierte ich an der tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München, wo ich am 25.7.1955 die tierärztliche Vorprüfung und am 29.7.1958 die tierärztliche Hauptprüfung bestand.

Meine Approbation als Tierarzt erhielt ich am 15. Mai 1959 von der Bayerischen Staatsregierung München.

INSTRUCTIONS

These instructions are intended to guide you in the use of the instrument. They should be read carefully and followed exactly as given. The instrument is designed to give accurate results only when used in accordance with these instructions.

The instrument is a simple and easy to use device. It is designed to give accurate results only when used in accordance with these instructions. The instrument is a simple and easy to use device. It is designed to give accurate results only when used in accordance with these instructions.

The instrument is a simple and easy to use device. It is designed to give accurate results only when used in accordance with these instructions. The instrument is a simple and easy to use device. It is designed to give accurate results only when used in accordance with these instructions.

The instrument is a simple and easy to use device. It is designed to give accurate results only when used in accordance with these instructions. The instrument is a simple and easy to use device. It is designed to give accurate results only when used in accordance with these instructions.

